

DIE MEMBRANGEBUNDENE NEURAMINIDASE

Pathobiochemische und enzymkinetische
Untersuchungen

Bernhard Pallmann

1981
1

DIE MEMBRANGEBUNDENE NEURAMINIDASE

Pathobiochemische und enzymkinetische Untersuchungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von Bernhard Pallmann aus München

München 1980

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Sandhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der Einreichung: 15. Oktober 1980

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Februar 1981



Herrn Prof. Dr. Sandhoff bin ich für die Anregung
zu dieser Arbeit, sowie seine stetige Förderung und
wohlwollenden Diskussionen zu großem Dank verpflichtet.

meiner Mutter gewidmet

	Seite
1.	1
1.1.	10
1.2.	11
2.	12
2.1.	12
Studien über Neuraminidase-Mangelerkrankungen (Sialidosen, Mucopolipidosen) im Hirngewebe sowie Hautfibroblasten- und Leucozytenkulturen	
2.1.1.	12
2.1.2.	15
Untersuchung von postmortalem Hirngewebe von Patienten mit ML I und ML II	
2.1.3.	22
Untersuchung der Neuraminidaseaktivität in Haut- fibroblasten und Leucozyten eines Patienten mit "Adult type neuronal storage-disease"	
2.1.4.	25
Kurzzusammenfassung der pathobiochemischen Untersuchungen	
2.2.	27
2.2.1.	27
2.2.2.	32
Wirkung von Triton X-100, Halothan und Diäthyl- äther auf die Aktivität der membrangebundenen Neuraminidase	
2.2.3.	36
Stimulierung des Gangliosidabbaus durch klinische Halothankonzentrationen	
2.2.4.	38
Aktivität der membrangebundenen Neuraminidase in Gegenwart verschiedener Inhibitoren	
2.2.5.	43
Puffer- und Ionenabhängigkeiten der membrange- bundenen Neuraminidase	
2.2.6.	45
pH-Wert- und Pufferabhängigkeit der Substratspal- tung durch die Neuraminidase	
2.2.7.	49
Ionenabhängigkeit der membrangebundenen Neuramini- dase	
2.2.8.	51
Lipidabhängigkeit der membrangebundenen Neuramini- dase	
2.2.9.	57
Einbau mizellarer Ganglioside in mikrosomale Membranen	
2.2.10.	65
Extraktionsstudien zur Reinigung der membrange- bundenen Neuraminidase	

2.2.11.	Stabilität und säulenchromatographische Reinigungsversuche der extrahierten Neuraminidase	70
3.	Zusammenfassung und Diskussion	72
3.1.	Pathobiochemische Untersuchungen	72
3.2.	Enzymkinetische Untersuchungen	76
3.2.1.	Lipide als Partner membrangebundener Enzyme	76
3.2.2.	Die Wechselwirkung der membrangebundenen Neuraminidase mit wasserlöslichen und Lipid-Substraten	77
3.2.3.	Die hydrophobe Bindungsstelle der membrangebundenen Neuraminidase	78
3.2.4.	Die Wirkung membranfluidisierender Agenzien auf die Umsatzraten der Neuraminidasesubstrate	79
3.2.5.	Die Bedeutung der Fluidität für biologische Membranen	81
4.	Literaturverzeichnis	84
5.	Material und Methoden	91
5.1.	Verwendete Materialien und Geräte	91
5.2.	Methoden zur Bestimmung der Neuraminidaseaktivität	92
5.2.1.	Isolierung von Mikrosomen aus Kalbshirn	92
5.2.2.	Herstellung von Gewebhomogenaten und löslichen Enzympräparationen humanen Ursprungs	92
5.2.3.	Durchführung des enzymatischen Standardtests mit Sialyllactit als Substrat	93
5.2.4.	Durchführung des enzymatischen Standardtests mit Gangliosid G_{D1a} als Substrat	94
5.2.5.	Durchführung des enzymatischen Standardtests mit Gangliosid G_{M3} als Substrat	95
5.3.	Bestimmung von lipid- und proteingebundener Sialsäure	96
5.4.	Bestimmung des Sialyloligosaccharidgehaltes in humanen Gewebeproben	97
5.5.	Messung der Mikroviskosität in Membranphasen	97
5.5.1.	Mikroviskositätsmessungen mit Reinlipiden	99
5.5.2.	Darstellung von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin-Liposomen und Bestimmung der Mikroviskosität	100
5.5.3.	Mikroviskositätsbestimmung in Mikrosomensuspensionen	101
5.6.	Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Halothan zwischen Gas-, Puffer- und Membranphase	101

5.7.	Einbau mizellarer Ganglioside in Mikrosomen	102
5.8.	Kontrollversuche	103
5.9.	Dünnschichtchromatographie	104
5.10.	Zellzüchtung	104
5.11.	Proteinbestimmung	105
5.12.	Handversuch zur Bestimmung des Gangliosidmusters in postmortalen Hirngeweben von Morphinsüchtigen	105
6.	Zusammenfassung	106
	Lebenslauf	108

Die membrangebundene Neuraminidase

Pathobiochemische und enzymkinetische Untersuchungen

1. Einleitung

"Biological membranes play a crucial role in almost all cellular phenomena yet our understanding of the molecular organization of membranes is still rudimentary." (1)

Die wesentlichen Bestandteile biologischer Membranen sind Lipide und Proteine. Seit den grundlegenden Arbeiten von Thudichum hat es nahezu einhundert Jahre gedauert, bis Singer und Nicolson die vorliegenden elektronenmikroskopischen und physiko-chemischen Daten in einer dynamischen Modellvorstellung zusammenfaßten (1,2), die biologische Membranen als semifluide Lipiddoppelschicht mit ein-(integralen) und angelagerten (peripheren) Proteinen beschreibt.

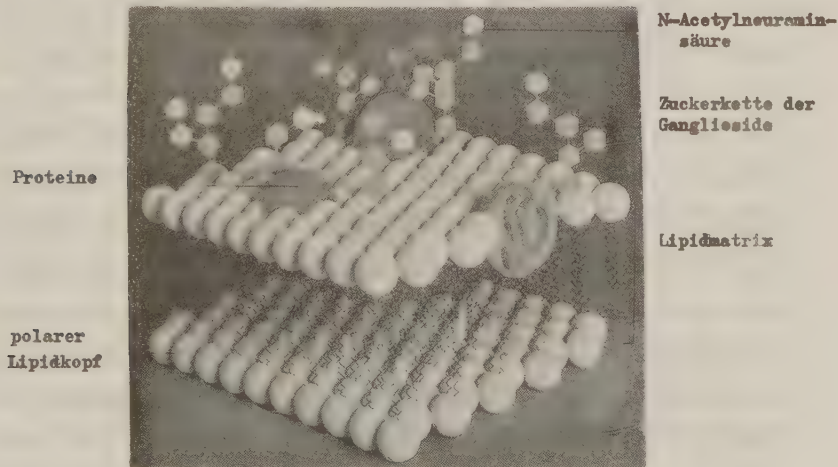


Abb. 1 Das "fluid mosaic modell", nach Singer und Nicolson (1), verändert. Schematischer Ausschnitt einer Lipidmembran; die braunen Kugeln stellen die Proteine, die weißen Kugeln die negativ geladenen, hydrophilen Bereiche der Lipide, die schwarzen Wendel die hydrophoben Fettsäurereste dar. Geseigt sind auch die (grünen) Zuckerketten der Ganglioside, die zur Klasse der Glycosphingolipide gehören; die kupferfarbenen Sechsecke stehen für den integralen Bestandteil aller Ganglioside, die N-Acetylneuraminsäure.

In der lebenden Zelle können Proteine unterschiedliche Funktionen übernehmen:

- 1) Spezifische Bindung von Molekülen (Rezeptorproteine)
- 2) Inter- und intrazellulären Stofftransport (Transportproteine)
- 3) Synthese und Abbau von Zellbestandteilen (Enzymproteine)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Protein, das zur Klasse der Enzymproteine gehört. Da zu erwarten ist, daß sich beim Abbau membranständiger Substrate durch membranassoziierte Enzyme die Eigenschaften der Zellmembran verändern, wird in der vorliegenden Arbeit über ein Schlüsselenzym im Lipidmetabolismus - vorgestellt am Beispiel der membrangebundenen Neuraminidase - berichtet.

Ganglioside als Substrate des Enzyms Neuraminidase

Während viele Membranproteine nur durch schwache elektrostatische Kräfte an die Lipidmatrix assoziiert sind und bereits durch einfache mechanische Behandlung (z.B. Ultraschall) oder Erhöhung der Salzkonzentration (3) von diesen abgelöst werden können, sind Lipide wegen ihrer hydrophoben Bereiche nur mit membranaturierenden, organischen Reagenzien aus Geweben zu lösen. So erhält man durch Extraktion mit Aceton die Lipide Cholesterin und seine Ester, mit Diäthyläther die meisten Phospholipide (z.B. Lecithin) und gelangt nach Eintrocknen der zurückbleibenden Masse und anschließender Dialyse gegen Wasser zur sog. "Protagonfraktion" (2). Die Zusammensetzung dieser Lipidmischung erschien vielen Wissenschaftlern derart geheimnisvoll, daß ihnen der Name "Sphingolipide" (Sphinx) für diese Fette angemessen erschien (4).

Ernst Klenk (5,6) trennte als erster die Protagonfraktion systematisch auf. Dabei arbeitete er vor allem mit postmortalem Hirngewebe von Patienten, die an "amaurotischer Idiotie" verstorben waren. In diesen Geweben war der Anteil der gesuchten Glykolipide wesentlich höher als im Gehirn von Kontrollen,

so daß Klenk nach Extraktion und anschließender fraktionierter saurer Hydrolyse die Zucker Glucose und Galactose, den langkettigen Aminoalkohol Sphingosin sowie Stearinsäure isolieren konnte. Daneben fand er eine bis dahin unbekannte Substanz mit freier Carboxylgruppe, deren Reindarstellung Blix (7) aus Körperschleimen von Schafen gelang und die als "Sialinsäure" (Sialsäure, Lactaminsäure, Nonulonsäure, N-Acetylneuraminsäure) bezeichnet wurde.

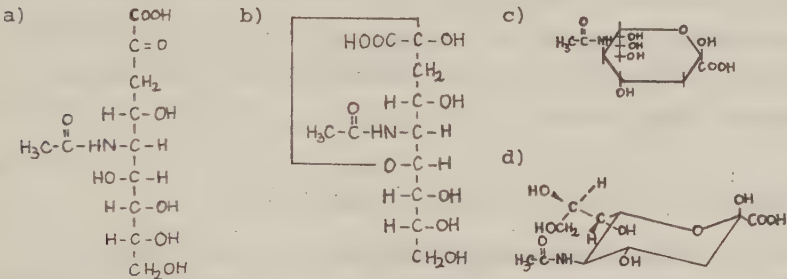


Abb. 2 Struktur der N-Acetylneuraminsäure in der

- a) offenkettigen (keto-) Form b) Fischer Projektionsform
c) Pyranose Form nach Haworth d) Sesselkonfiguration (8)

Da alle Sphingolipide, die diesen sauren Zucker enthielten, sich durch eine charakteristische Purpurfärbung (in Gegenwart von heißer, verdünnter Salzsäure sowie etwas Orcinol und Kupfer) vor allem im Nervengewebe nachweisen ließen, gab ihnen ihr Entdecker E. Klenk den Namen Ganglioside.

Die Biosynthese dieser Glycolipide startet mit dem Aufbau des hydrophoben Fettsäureanteils, des Ceramids. Dieses Säureamid wird aus Sphingosin, dem enzymatisch, Pyridoxalphosphat-katalysiertem Kondensationsprodukt aus Serin und Palmitoyl-Coenzym A, und einer weiteren ($C_{18}-C_{24}$) Fettsäure gebildet. Nach der Einwirkung einer Reihe verschiedener Zuckertransferasen, die für die Anlagerung der Zucker Glucose, Galactose, N-Acetylgalactosamin und N-Acetylneuraminsäure verantwortlich sind, steht am Ende der Biosynthese das komplexe Muster der Oligosialylganglioside(9).

Der Abbau dieser Substanzgruppe vollzieht sich unter der katalytischen Wirkung verschiedener Zucker-Hydrolasen. Dabei werden die Ganglioside - ausgehend von ihrem terminalen, hydrophilen Ende - Schritt für Schritt in das entsprechende Monosaccharid und das Glycolipid, letztendlich in die Fettsäure und den Aminolalkohol Sphingosin gespalten. Am Beginn dieser Abbauskaskade steht das Enzym Neuraminidase (N-Acylneuraminyl-Hydrolase; E.C. 3.2.1.18), das neben den Gangliosiden auch andere sialsäurehaltigen Verbindungen (z.B. Sialyl-Glycoproteine, Sialyl-Oligosaccharide) mit unterschiedlicher Spezifität als Substrate akzeptiert (10). In den letzten Jahren wurden neben wasserlöslichen Neuraminidasen auch mehrere membran-gebundene Formen entdeckt (siehe Tab. 1; S.5).

Ganglioside - Vorkommen, Strukturen und Eigenschaften

Aus Rohextrakten von Nervengewebe lassen sich Ganglioside heute durch säulen- und dünn-schichtchromatographische Methoden (11, 12) in hoher Reinheit darstellen:

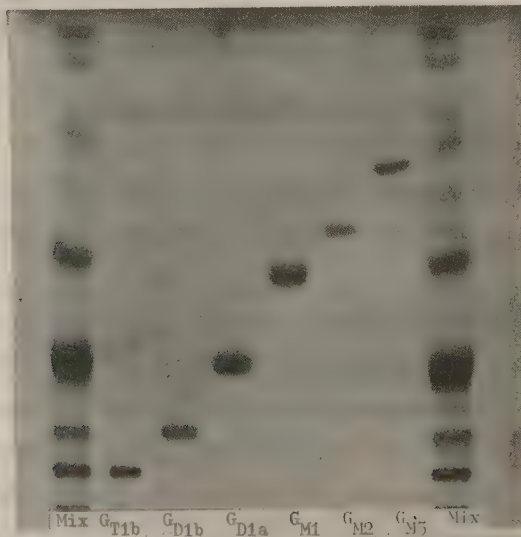


Abb. 3 Photographische Aufnahme einer Dünnschichtplatte mit Gangliosiden
Adsorbens: Kieselgel G; Laufmittel 1; Entwicklung vgl. Abschn. 5 (Material
und Methoden). Mix = Rohgemisch aus Rinderhirn, zur Nomenklatur vgl. (11)
und Abb. 4, S. 7

Tab. 1

Enzymquelle und pH-Optima für Säuger-Neuraminidasen

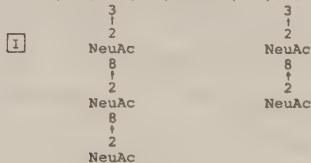
Quelle	Fraktion	Substrat	pH-Optimum	Literatur
Hirn von Meer - schweinchen, Rind, Mensch	Gesamthomogenat	endogene, sialsäure- haltige Verbindungen	3.5-4.0	(13)
Kalbshirn	Graue Substanz (Acetonpulver)	Di-, Trisialoganglio- side und G _{M3}	4.4 ²⁶⁻²⁸	(14)
Schweinehirn	Gesamthomogenat	Ganglioside und Sialyllactose	4.7-4.9	(15)
Schweinehirn	Cytosol	Mucin	4.4	
Hasenhirn	105.000 g pellet	Gangliosid G _{D1a}	4.0	(16)
Rinderhirn	Lysosomen-Mito- chondrien	Rinderhirn- Ganglioside	4.3	(17)
Menschenhirn	Graue Substanz (Acetonpulver)	endogene sowie exogene Ganglioside	4.4	(18)
Rinderhirn	Synaptische Membranen	endogene sowie exogene Ganglioside	4.3	(19)
Rattenleber	Lysosomen	Sialyllactose und Glycoproteine	4.0-4.4	(20)
Rattenleber	Lysosomale Membranen	Sialyllactose	4.4	(21)
Rattenleber	Lysosomen (lösliche Fraktion)	Sialyllactose	5.8	(22)
Rattenleber	Plasmamembranen	endogene sowie exogene Ganglioside	4.2	(23, 24)
Rattenleber	Plasmamembranen	Sialyllactose	3.9	(24)
Rattenleber	Golgimembranen	Sialyltrisaccharide	4.2	(25)
Rattenleber	Lysosomen	Rinderhirn- Ganglioside	4.2	(24)
Haseniere	lösliche Fraktion	Seromucoid und Sialyllactose	5.5	(26)
Ratteniere	Lysosomen	Sialyllactose	4.4	(20)
Ratteniere	Lysosomen	Sialo-Glycoproteine	4.0	(20)
Schweineniere	Lysosomen- Mitochondrien	Sialyllactose	4.4	(27)
Milchdrüse der Ratte	lösliche Fraktion	Sialyllactose	5.8	(28)
	Lysosomen	Sialyllactose	4.4	(28)
Leukozyten	Membranfraktion	Sialyllactose	4.0	(29)
Rattenaugen Herzmuskel der Ratte	lösliche Fraktion	Sialyllactose	5.8	(30)
	Membranfraktion	Gangliosid G _{D1a}	5.0	(31)
	Membranfraktion	Gangliosid G _{M2}	5.0	(31)
Menschen- Erythrozyten	Membranfraktion	Fetuin und Sial- säure-Derivate	4.2	(32)

Wie in folgendem Schema (siehe Abb. 4; S.7) gezeigt ist, enthalten die einzelnen Ganglioside die Sialsäure in unterschiedlicher Menge. Gemeinsames Kennzeichen aller etwa 25 bisher gefundenen Gangliosiden ist die Bindung der Sialsäure an die Galactose (33), die offenbar ausschließlich α -ketosidisch und meist in der 2-3-Stellung erfolgt (33,34).

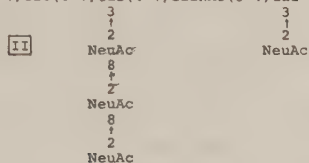
Im Gehirn der höheren Säuger erreichen die Ganglioside etwa zwei bis vier Gewichtsprozent des Gesamtlipidgehaltes (35), aber auch andere Säugerorgane oder das Nervengewebe von Fischen und Fröschen enthalten Ganglioside, wenn auch mit unterschiedlichen Zuckerstrukturen und in geringerem Maße (36, 37). Da diese Glycolipide vor allem in neuronalen Strukturen (38, 39) und dort nahezu ausschließlich in den Plasmamembranen der Nervenendigung zu finden sind (40,41,42,43,44,45), hat es nicht an Vermutungen gefehlt, ihnen spezifische Funktionen bei der Signalübertragung zwischen Nervenzellen zuzuschreiben.

Grundlage für diese Vermutungen waren Untersuchungen von Avrova et al. (46, 47), die einen Zusammenhang zwischen dem Gangliosidgehalt verschiedener Spezies und dem Differenzierungsgrad ihres Nervensystems feststellten. Drastische Veränderungen des Gangliosidmusters während der Entwicklungsphase, vor allem aber die Veränderungen der Gangliosidzusammensetzung während der Tumorgenese (48,49,50,51,52,53,54,55), bei biologisch oder chemisch induzierten malignen Prozessen an Nervenzellen (56,57), führten zu der Regel, daß eine Ausdifferenzierung von Zellgewebe meist mit einer Erweiterung des Gangliosidmusters einhergeht. Auf Grund dieser Beobachtungen wenden sich in jüngster Vergangenheit vermehrt Arbeitsgruppen der Erforschung der noch weitgehend unbekannten Funktionen dieser Substanzgruppe zu: Neben verfeinerten Methoden zur Klärung der physiko-chemischen Eigenschaften von Gangliosiden in Lipidphasen (58,59,60), die genauere Lokalisation dieser Glycolipide im Nervengewebe (61,62,65), finden sich in zunehmendem Maße Studien über ihre Rolle beim Ionentransport (64,65),

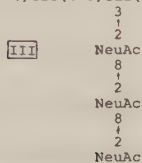
Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc(3-1)Gal



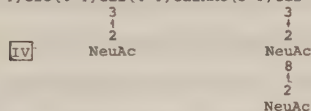
Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc(3-1)Gal



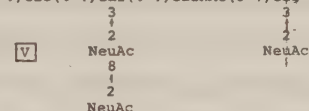
Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc(3-1)Gal



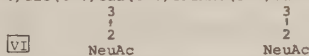
Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc(3-1)Gal



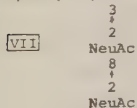
Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc(3-1)Gal



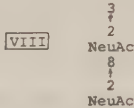
Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc(3-1)Gal



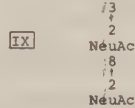
1-1)Glc(4-1)Gal



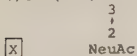
Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc(3-1)Gal



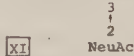
Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc



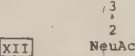
1-1)Glc(4-1)Gal



Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc(3-1)Gal



Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc



ALLO-DERIVATE

Cer(1-1)Glc(4-1)Gal
(Lactosylceramid)

Cer(1-1)Glc(4-1)Gal(4-1)GalNAc
(Glycolipid G_{A2})

irzungen:

= Ceramid; Glc =Glucose; Gal = Galactose; GalNAc = N-Acetyl-Galactosamin; NeuAc = N-Acetyl-Neuramin-
re;

die einzelnen Ganglioside werden im Text die Kurzbezeichnungen nach Svennerholm verwendet(1). In

½ bedeutet: **I** = G_P ; **II** = G_{Q1} ; **III** = G_{TO} ; **IV** = G_{T1a} ; **V** = G_{T1b} ; **VI** = G_{D1a} ; **VII** = G_{D3} ;

VIII = G_{D1b} ; **IX** = G_{D2} ; **X** = G_{M3} ; **XI** = G_{M1} ; **XII** = G_{M2} ;

bei der Übertragung von Nervenimpulsen (66) und die Rezeptoreigenschaften dieser Glycolipide für bakterielle Toxine (z.B. Cholera- und Tetanustoxin) (67,68,69), Hormone (z.B. Schilddrüsen-stimulierendes Hormon)(70,71), ihr Einfluß beim Auswachsen von Nervenfasern (72,73,74) und der Kontaktvermittlung von Zellmembranen (75). Jüngste Arbeiten über die Bildung von Antikörpern gegen bestimmte Ganglioside in immunisierten Kanninchen (76,77), sowie Untersuchungen über Anti-Gangliosid-Antikörper bei Patienten mit Multipler Sklerose und anderen Erkrankungen (78) deuten das wachsende Interesse an diesen Lipiden an.

Die Frage nach den bisher noch weitgehend ungeklärten Funktionen dieser Substanzgruppe ist eng verknüpft mit der Notwendigkeit, die Regulationsmechanismen des Gangliosidstoffwechsels durch die beteiligten Enzyme verstehen zu lernen. Betrachtet man den Abbau und den Initialschritt der Enzymeinwirkung, so entstehen als Produkte der enzymatisch-katalysierten Reaktion wasserlösliche Monosaccharide und amphiphile Oligosialyl-, Monosialyl- oder Asialyl- (Glycolipide ohne Sialsäure)-Derivate. Während die Monosaccharide den Membranverband verlassen können, verbleiben die entstehenden Glycolipide wegen ihrer ungenügenden Lösungseigenschaften im Cytosol (79) in der ursprünglichen Membran. Bei Störungen im Abbaumechanismus kommt es deshalb zur Anhäufung bestimmter Ganglioside in den betroffenen Membranen (80). Diese genetisch bedingten Defekte des jeweils abbauenden Enzyms manifestieren sich vor allem in den intrazellulären Verdauungsorganellen, den Lysosomen, und sind seit Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe.

Auffallend war, daß bei diesen Krankheiten die gespeicherten Substrate an ihrem hydrophilen Ende ausschließlich die Zucker Galactose, Glucose oder N-Acetylgalactosamin enthielten, nicht jedoch einen endständigen Sialsäurerest. Dieser Umstand veranlaßte uns, gerade den Abbau von

Gangliosiden mit endständiger Sialsäure näher zu studieren. Da beide Reaktanden - Ganglioside und Neuraminidase - in membrangebundener Form vorliegen, sollten vergleichende Studien mit lipidgebundenen und wasserlöslichen Substraten des Enzyms Aussagen über die Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat in der Membranebene zulassen. Im Kapitel "Enzymkinetische Untersuchungen" wird über diese Arbeiten berichtet.

Neuraminidase - Mangelkrankheiten

Wie bereits erwähnt, werden neben den Gangliosiden mit endständiger Sialsäure auch andere Verbindungen (Sialyl-Glycoproteine, Sialyl-Oligosaccharide) von Neuraminidasen akzeptiert. Neuere Arbeiten über Sialidase-Mangelkrankheiten (sog. "Mucopoliposen", Sialidosen) konnten zeigen, daß im Urin der betroffenen Patienten erhöhte Raten sialsäurehaltiger Oligosaccharide ausgeschieden werden (81,82,83). Die Ursache hierfür ist offenbar im Fehlen einer in der Membran ~~von~~ Lysosomen lokalisierten Neuraminidase zu suchen, wobei bisher nicht bekannt ~~war~~, ob es mehrere lysosomale Neuraminidasen gibt. Bei diesen Krankheiten wurden bis heute nur extraneuronale Gewebe (vor allem Fibroblastenkulturen) untersucht, an denen zwar eine Anreicherung von Sialyl-Oligosacchariden jedoch keine Hinweise auf eine Speicherung von Gangliosiden festgestellt wurden. Die im Kapitel "Pathobiochemische Untersuchungen" vorgestellten Arbeiten konzentrierten sich deshalb auf Studien mit postmortalem Nervengewebe von Patienten mit den bekannten Mucopoliposen Typ I und Typ II, sowie der Untersuchung verschiedener Zellgewebe eines Patienten mit "Adult type neuronal storage disease". Die Ursache dieser Erkrankung war bisher unbekannt.

1.1. Zielsetzung der Arbeit

1. a) Lassen sich bei den Krankheiten Mucopolipidose I und II (81, 82) auch Hinweise auf einen Defekt des Enzyms Neuraminidase in post-mortalem Nervengewebe finden?
 - b) Leitet eine andere als die lysosomale Neuraminidase, z.B. die Neuraminidase der Plasmamembran, den Gangliosidabbau ein?
 - c) Werden bei diesen Krankheiten mit lysosomalem Neuraminidasedefekt Ganglioside im Nervengewebe gespeichert?
2. Bei einer weiteren Erbkrankheit (adult type neuronal storage disease) mit Sialyloligosaccharidausscheidung im Urin sowie einer Vermehrung des Monosialylgangliosids G_{M3} in den Ganglienzellen (83) sollte nach einem möglichen Enzymdefekt gesucht werden.
3. In eigenen Vorarbeiten(84,85,86) wurde für den Gangliosidabbau durch die membrangebundene Neuraminidase folgendes membranenzymologisches Konzept vorgeschlagen:

Die Wechselwirkung von Substraten und Enzymen innerhalb der Membranebene vollzieht sich durch Lateraldiffusion der Reaktionspartner. Ist dieser Diffusionsparameter geschwindigkeitsbestimmend für die enzymatische Reaktion, so sollte eine Fluiditätserhöhung zu einer Umsatzsteigerung membrangebundener Substrate, jedoch nicht der wasserlöslicher Substrate führen.

Erste Hinweise für eine Bestätigung dieses Konzeptes konnten bereits durch Fluidisierungsstudien erbracht werden (87,88). In der vorliegenden Arbeit sollten weitere Messungen die Tragfähigkeit der aufgestellten Behauptung überprüfen:

Welchen Einfluß besitzen Ionenstärke und pH-Wert auf die Umsatzraten der Substrate?

Welche Konsequenzen ergeben sich durch Einbau von fluidisierenden (z.B. Lysolecithin) Lipiden oder Inhibitoren (z.B. Gangliosid G_{M1}) in die Membranen?

Um eine weitere Charakterisierung der membrangebundenen Neuraminidase zu ermöglichen, wurden darüberhinaus Solubilisierungsstudien unternommen.

1.2. Zur Gliederung der vorliegenden Arbeit

Obwohl die pathobiochemischen Studien an humanen Geweben weitgehend parallel mit den membranenzymologischen Versuchen an Kalbshirnmikrosomen durchgeführt wurden, sollen die Ergebnisse der Patientenuntersuchung an den Beginn der Arbeit gestellt werden, da an ihnen die Notwendigkeit zur weiterführenden Charakterisierung des vorgestellten Systems deutlich wird.

2. Ergebnisse

2.1. Pathobiochemische Untersuchungen

Studien über Neuraminidase-Mangelerkrankungen (Sialidosen, Mucopolipidosen) im Hirngewebe sowie Hautfibroblasten- und Leukozytenkulturen

2.1.1. Ausgangspunkt

Die in den vergangenen Jahren unter der Bezeichnung "Mucopolipidosen" (Sialidosen) beschriebenen Krankheiten sind durch erhöhte Ausscheidungsraten von Sialyloligosacchariden im Urin der Patienten und dem Ausfall des Enzyms Neuraminidase (N-Acetylneuraminsäure Hydrolase E.C. 3.2.1.18) charakterisiert worden (82, 89). Die bisher meist an Hautfibroblastenkulturen der betroffenen Patienten durchgeführten Studien gestatten eine Einteilung der Sialidosen in zwei Gruppen, die sich sowohl klinisch als auch biochemisch unterscheiden:

Zur Gruppe 1 sind Erkrankungen zu zählen, bei denen die Patienten im Kleinkindalter durch Bewegungsstörungen, Krämpfe sowie Sprach- und Sehschwierigkeiten auffallen und trotz schubartiger Verschlechterung des Allgemeinzustandes oft das Alter von fünfzig und mehr Jahren erreichen.

Biochemisch ließen sich an Zellkulturen der Ausfall des Enzyms Neuraminidase (bei der Mucopolipidose I, Abk.: ML I oder beim sog. "Cherry red spot myoclonus syndrome") (89,90) oder ein partieller Ausfall des Enzyms β -Galactosidase (bei der sog. "Adult type neuronal storage disease", Abk.: ATNS) (83) nachweisen.

Bei der Gruppe 2 (Mucopolipidose II, Abk.: ML II bzw. I-cell disease, Mucopolipidose III) handelt es sich um Krankheiten, deren Verlauf bereits kurz nach der Geburt durch schwere morphologische und neurologische Defekte gekennzeichnet ist, so daß sie bereits im Kleinkindalter zum Tode des Patienten führen. Der Ausfall mehrerer lysosomaler Enzyme, Speichergranula im Zellgewebe sowie sehr hohe Ausscheidungsraten von Sialyloligosacchariden im Urin weisen auf eine gemeinsame Störung bei der Biosynthese metabolisierender Enzyme hin (91,92, 111a).

Gemeinsames Kennzeichen der beiden Gruppen 1 und 2 ist der Defekt des Enzyms Sialidase (Neuraminidase) in Fibroblastenkulturen, die mit wasserlöslichen Substraten untersucht wurden.

Da Organ- und Substratspezifitäten unbekannt waren, versuchten wir den Neuraminidasedefekt auch in postmortalem Hirngewebe - diesmal jedoch sowohl mit wasserlöslichen Substraten als auch mit lipidgebundenen Substraten wie Gangliosiden - an je einem Fall der Mucopolidose I (ML I) und Mucopolidose II (ML II) nachzuweisen. Ein dritter, noch lebender Patient mit unbekanntem Enzymdefekt wurde an Hand klinischer und zellmorphologischer Daten als ATNS-Patient ("Adult type neuronal storage disease") klassifiziert. Zellmaterial (Fibroblasten, Leucozyten) dieses Patienten wurden uns von Prof. Miyatake (Dept. of Neurology, Jichi Med. School, Tochigi, Japan) zur Untersuchung der Neuraminidaseaktivität zugesandt.

Kurze Fallbeschreibung

a) Mucopolidose I; ML I

Der von Spranger et al. (93) beschriebene männliche Patient wurde im Alter von zwei Jahren mit einer psychomotorischen Entwicklungsverzögerung auffällig, besaß im Jugendalter bereits "gargoyl-like" (Wasserspeier-) Gesichtszüge, litt an schweren Skelettveränderungen, zunehmendem cerebralem Abbau und wiederholten Krampfanfällen. Er verstarb im Alter von 21 Jahren bevor eine Enzymanalyse durchgeführt werden konnte. Der Sialsäuregehalt der Leber war um das Zehnfache erhöht, die Sialidaseaktivität der elterlichen Fibroblasten erreichte die Hälfte der Kontrollwerte. Das nach der Obduktion präparierte Hirngewebe wurde für 1 Jahr bei -20°C gelagert.

b) Mucopolidose II; ML II

Bereits während der ersten Lebensmonate zeigte der männliche Patient die für die ML I beschriebenen Symptome. Aufrechtes Sitzen oder Stehen vermochte er niemals zu erlernen. Er starb im Alter von 2 Jahren, kultivierte Fibroblasten der Haut zeigten die für die ML II charakteristischen Einschlüsse, eine Reihe lysosomaler Enzyme war im Patientenserum erhöht(94). Da nur etwa

2 Gramm an postmortalem Hirngewebe zur Verfügung standen, ließ sich ein partielles Auftauen von -20°C auf Temperaturen um den Gefrierpunkt beim Schneiden und Zerkleinern des Gewebes nicht vermeiden.

c) Adult type neuronal storage disease; ATNS

Der zum Zeitpunkt der Untersuchung lebende, 48jährige Patient zeigte ähnliche klinische Auffälligkeiten, wie sie für die Krankheiten ML I und ML II beschrieben sind. Der Krankheitsverlauf war jedoch wesentlich langsamer. Es wurden zudem kirschrote Flecke am Augenhintergrund festgestellt.

Biopsien der Ganglien des sympathischen Nervensystems zeigten eine Speicherung der Ganglioside G_{M3} (49-fach) und G_{M2} (25-fach) gegenüber Kontrollwerten. Sialyloligosaccharide wurden im Patientenurin ausgeschieden, die Fibroblastenkulturen wurden von Hautbiopsien des Patienten und gleichaltrigen Kontrollpersonen angelegt* (83).

✱

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Höna für die Betreuung der Zellkulturen herzlich bedanken.

2.1.2. Untersuchung von postmortalem Hirngewebe von Patienten mit ML I und ML II

Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse basieren auf den im Teil 5. dieser Arbeit sowie bereits früher vorgestellten Methoden. Die Messungen zur Enzymaktivität erfolgten nach (84, 87, 95, 96, 97), die Bestimmung von lipid- und proteingebundener Sialsäure nach (98, 99), quantitative Bestimmungen des Neuraminsäuregehaltes nach (100), die dünnschichtchromatographische Auftrennung von Sialyloligosacchariden nach (101).

Die Neuraminidaseaktivitäten in postmortalen Hirngeweben von Patienten mit ML I und ML II wurden mit den beiden Substraten Sialyllactit und Gangliosid G_{D1a} (vgl. Abschn. 5) bestimmt. Um zwischen wasserlöslichen und membrangebundenen Enzymen unterscheiden zu können, wurden Aliquote von 10%-Hirngesamthomogenaten in entionisiertem Wasser (pH 6.9-7.1), resuspendierte 100.000 g Pellets sowie deren Überstände der enzymatischen Analyse unterzogen. Die in den Tab. 2 und 3 zusammengefaßten Ergebnisse zeigten im Vergleich zu den Kontrollwerten für die ML I nahezu normal Enzymaktivitäten, während - vor allem mit dem wasserlöslichen Substrat Sialyllactit - die ML II-Werte nur maximal 30 Prozent der Kontrollaktivitäten erreichten. Die angegebenen Aktivitäten sind auf mmol an jeweils gespaltenem Substrat pro 1 Stunde und 1 mg Protein normiert:

Tab.2 Neuraminidaseaktivität mit Gangliosid G_{D1a} als Substrat in postmortalen Hirngeweben von Patienten mit ML I und ML II

	Homogenat	Pellet	Überstand
	(nmol/hr.mg Protein)		
Kontrollen (n=2; 24 u.26 Jahre alt)	12.0 (9.0-14.5)	11.5 (5.6-17.5)	1.6 (0.5-2.6)
ML I (21 J.)	8.7 (8.2-9.0)	8.4 (7.1-9.7)	0.9 (0.4-1.4)
ML II (2 J.)	6.3 (2.5-9.0)	3.5 (3.3-3.7)	0.7 (0.2-1.1)

Tab.3 Neuraminidaseaktivität mit Sialyllactit als Substrat in postmortalen Hirngeweben von Patienten mit ML I und ML II

	Homogenat	Pellet (nmol/hr.mg Protein)	Überstand
Kontrollen (n=2; 24 u. 26 Jahre alt)	4.3 (3.4-5.3)	6.9 (5.6-7.2)	0.55 (0.35-0.75)
ML I (21 J.)	4.1 (1.9-7.3)	6.1 (4.0-8.3)	0.44 (0.09-0.81)
ML II (2 J.)	1.4 (1.0-1.9)	2.4 (1.3-3.5)	0.12 (0.03-0.2)

Insgesamt wurden nur zwischen 1 und 7 Prozent der gesamten Enzymaktivität im 100.000 g Überstand gefunden. Der überwiegende Anteil an Neuraminidaseaktivität liegt also im Hirn in membrangebundener Form vor. In Tab. 3 fällt auf, daß die Werte für den ML II-Patienten nur etwa 30 Prozent der Kontrollwerte erreichen. Wenn auch von anderen Autoren an Fibroblastenkulturen verminderte Enzymaktivitäten bei dieser Krankheit festgestellt wurden (102,103,104), so können bei den gezeigten Daten auch andere Faktoren (z.B. kurzzeitiges Auftauen der Gewebeschnitte bei der Enzympräparation, teilweiser Enzyminaktivierung durch wiederholtes Einfrieren des Gewebes) zu einer Verminderung der Enzymaktivität beigetragen haben; die geringe Menge an Material (2 Gramm) verhinderte jedoch, diese Fragen durch Untersuchung der Einfrier- und Auftaulabilität des Enzyms im Vergleich zu weiteren pathologischen Gewebeproben zu klären.

Da mit keinem der beiden Substrate ein klarer Enzymdefekt nachgewiesen werden konnte, untersuchten wir in den ML I und ML II Hirngeweben die Aktivitäten von sieben lysosomalen Enzymen nach etablierten Methoden (95) unter Verwendung chromogener (4-Methylumbelliferyl-) Zuckerderivate. Um auch Isoenzyme zu erfassen, wurde Gesamthomogenat eingesetzt, das als 10%ige Suspension in 0.25% Triton X-100 homogenisiert worden war. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefaßt:

Tab. 4 Glycosidase Aktivitäten in postmortalem Hirngewebe von Patienten mit ML I und ML II

Saure Phosphatase		N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase	β -D-Galactosidase	α -Fucosidase	α -Galactosidase	β -D-Glucosidase
		(nmol/hr-mg Protein)				
Kontr.	1353	867	53	157	35	34
(24 Jahre)	(1313-1373)	(844-889)	(46-60)	(41-19)	(33-37)	(33-35)
Kontr.	1144	707	39	257	36	55
(26 Jahre)	(1107-1181)	(688-725)	(35-43)	(19-34)	(33-39)	(53-57)
ML I	1076	1910	19	542	60	39
(21 Jahre)	(1048-1104)	(1887-1933)	(12-26)	(512-572)	(50-70)	(36-42)
ML II	453	363	8	182	13	12
(4 Jahre)	(432-474)	(279-327)	(7-9)	(14.2-22.2)	(1.0-1.6)	(1.0-1.4)

Tab. 5 α -Mannosidase Aktivität in postmortalem Hirngewebe von Patienten mit ML I und ML II
(10 % -Homogenate in Wasser wurden 1 Stunde bei 100 000 g zentrifugiert)

(nmol/hr.mg Protein)			
	bei pH 4.0	bei pH 4.0 (+10mM Co^{2+})	bei pH 6.0 (+10mM Co^{2+})
Kontrolle (24 Jahre)			
Homogenat	9.6 (± 0.2)	7.4 (± 0.2)	19.1 (± 1.0)
Pellet	3.2 (± 0.2)	2.5 (± 0.3)	10.8 (± 0.2)
Überstand	28.4 (± 1.0)	21.3 (± 0.8)	22.4 (± 0.3)
Kontrolle (26 Jahre)			
Homogenat	14.8 (± 0.2)	10.5 (± 0.4)	25.1 (± 0.2)
Pellet	5.0 (± 0.5)	3.6 (± 0.2)	16.2 (± 0.4)
Überstand	42 (± 6)	28.3 (± 0.9)	33.7 (± 0.4)
ML I (21 Jahre)			
Homogenat	18.3 (± 1.1)	15.4 (± 0.6)	13.7 (± 0.3)
Pellet	3.4 (± 0.6)	7.7 (± 0.3)	15.6 (± 0.5)
Überstand	65 (± 4)	55.3 (± 1.0)	30.7 (± 0.8)
ML II (2 Jahre)			
Homogenat	14.3 (± 0.3)	9.8 (± 0.4)	7.7 (± 0.6)
Pellet	10.7 (± 0.8)	7.4 (± 0.2)	11.3 (± 0.9)
Überstand	30.3 (± 2)	19.6 (± 0.6)	9.8 (± 0.4)

Speziell für die α -Mannosidase (Tab. 5) wurde eine Methode zur Unterscheidung von löslichen (lysosomalen) und membrangebundenen (Golgi-) Isoenzymen beschrieben (96), die eine Auftrennung der Enzympräparation in Gesamthomogenat, 100.000 g Überstand und das resultierende Pellet notwendig machte.

Die in den Tabellen 4 und 5 aufgeführten Daten zeigen bei der Untersuchung

des ML I Gewebes Normalwerte für die Enzyme: Saure Phosphatase
 α -Mannosidase (bei pH=6,0)
 β -Glucosidase
erhöhte Werte für : α -Mannosidase (bei pH=4,0)
N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
 α -Fucosidase
 α -Galactosidase

hingegen eine geringe Erniedrigung für : β -D-Galactosidase im Vergleich zu den Kontrollwerten.

Ein anderes Bild ergab sich bei der Untersuchung des ML II Gewebes. Hier erreichten nur die α -Fucosidase und α -Mannosidase (bei pH=4,0) die normale Kontrollaktivität. Die α -Mannosidase (bei pH=6,0) war dagegen leicht, die Mehrzahl der anderen getesteten Enzymaktivitäten jedoch bis auf 30 Prozent (saure Phosphatase, N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase, α -Galactosidase, β -Glucosidase) oder 20 Prozent (β -D-Galactosidase) im Vergleich zu den Normalaktivitäten abgesunken. Die Hemmung der α -Mannosidaseaktivität bei pH=4,0 durch Cobaltionen, die für das lysosomale Enzym charakteristisch ist, sowie die Stimulierung des Golgi-Enzyms bei pH=6,0 durch Cobaltionen war jedoch im ML II Gewebe normal nachweisbar.

Obwohl also für beide Krankheiten (ML I und ML II) in Fibroblastenkulturen Defekte des Enzyms Neuraminidase (bei ML II auch der β -Galactosidase) (82,105), oder nur geringe Restaktivitäten dieser Enzyme (im Bereich zwischen 0-12 Prozent) gefunden wurden, sind klare Enzymdefekte im Nervengewebe der hier untersuchten Patienten nicht eindeutig nachweisbar. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein: So könnten für die Krankheiten Ausfälle bestimmter Isoenzyme verantwortlich sein, die im Nervengewebe nur eine untergeordnete Rolle

bei der Substratspaltung übernehmen und vor allem im extraneuronalen Gewebe benötigt werden. So sollte z.B. ein (partieller) Defekt einer Sialidase im Nervengewebe, der durch enzymatische Messungen nicht eindeutig nachgewiesen werden kann, zu Veränderungen im Gesamtsialsäuregehalt oder in dem Verteilungsmuster an lipid- und proteingebundener Sialsäure führen. Deshalb untersuchten wir die Verteilung der Sialsäure in den Patientengeweben und gleichaltrigen Kontrollpersonen bezüglich ihrer lipid- und proteingebundenen Anteile (Abb.4)

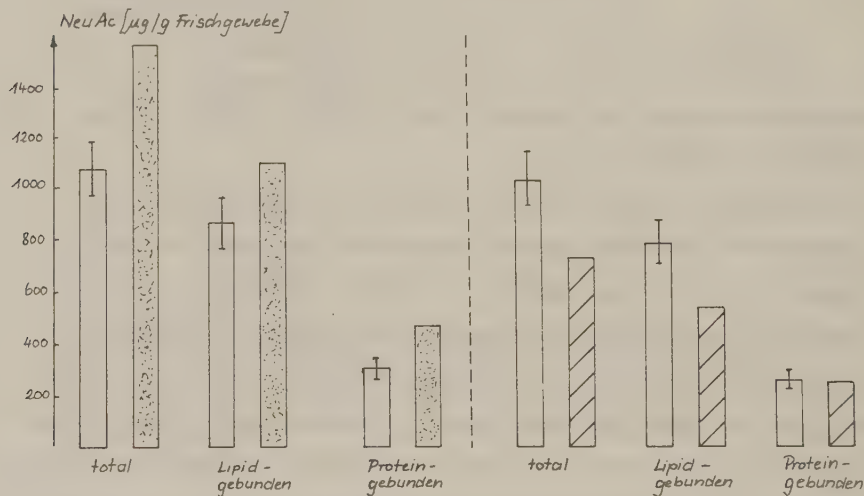


Abb. 4

Sialsäuregehalt in postmortalen Hirngeweben von Patienten mit ML I und ML II

- ☐ gleichaltrige Kontrollpersonen (n=5 bei ML I; n=3 bei ML II)
- ☒ ML I-Gewebe
- ☒ ML II-Gewebe

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Für das ML I Gewebe ergab sich nach Abb.4 ein geringer Anstieg an dem Sialsäuregehalt, der nahezu gleichmäßig auf den Lipid- und Proteinanteil verteilt war, während sich ein Abfall im ML II Gewebe auf den lipidgebundenen Anteil beschränkte. Die Ergebnisse aus Abb. 4 ließen sich durch eine separat durch-

geführte Analyse des Gangliosidmusters überprüfen und bestätigen (Abb.5):

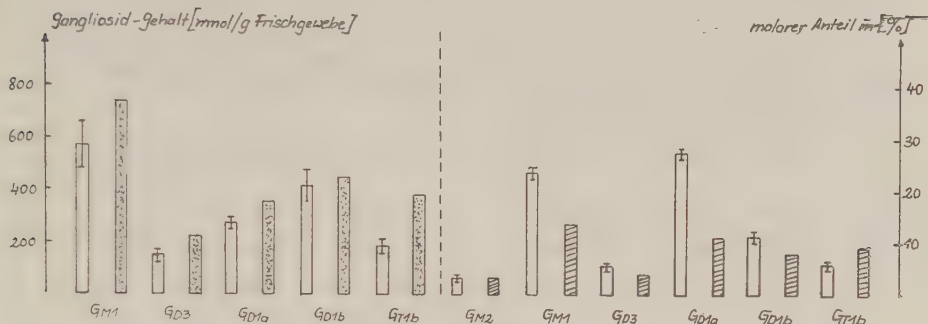


Abb. 5

Gangliosidgehalt in postmortalen Hirngeweben von Patienten mit ML I und ML II

□ gleichaltrige Kontrollpersonen (n=5 bei ML I; n= 3 bei ML II)

▤ ML I -Gewebe

▨ ML II -Gewebe

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Der Gehalt aller Ganglioside (Abb.5) im ML I Gewebe ist gegenüber den Kontrollwerten erhöht (beim Gangliosid G_{T1b} bis auf das Doppelte der Norm), im ML II Gewebe jedoch mit Ausnahme des Gangliosids G_{T1b} leicht erniedrigt. Parallel zu diesen Messungen untersuchten wir den Gesamtgehalt an wasserlöslichen, extrahierbaren Sialyloligosacchariden, die neben den Gangliosiden als Substrate für Neuraminidasen erkannt und, wie bereits erwähnt (siehe 2.1.1.Ausgangspunkt), im Patientenurin ausgeschieden werden: Nach mehrmaligem Homogenisieren des Hirngewebes in destilliertem Wasser, Zentrifugieren, nachfolgendem Gefrier-trocknen des 100.000 g Überstandes, Aufnahme des Trockengutes in Pyridin und dünn-schichtchromatographischer Analyse (101) fanden wir, daß der Gehalt an Sialyloligosacchariden in beiden pathologischen Geweben (ML I und ML II) auf das Doppelte der Kontrollwerte erhöht war. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß

neben der gangliosidspaltenden Neuraminidase im Nervengewebe noch andere, wahrscheinlich ebenfalls membranassoziierte Formen des Enzyms existieren, die für die Spaltung der Sialyloligosaccharide verantwortlich sind. Wie die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, sind die Substratspezifitäten dieser Enzyme nicht streng gerichtet:

Eine drastische Speicherung von Gangliosiden war in den pathologischen Geweben nicht feststellbar, d.h. das gangliosidspaltende Enzym ist vorhanden oder in seiner Aktivität nur leicht vermindert. Dieses Enzym kann offenbar beim Fehlen einer (Spuren-) Sialidase im Nervengewebe, die für Sialyloligosaccharide spezifisch sein könnte, zumindest teilweise die Rolle des Spurenenzyms übernehmen, so daß exogen zugesetzte Sialyloligosaccharide wie z.B. Sialyllactit zwar in vitro gespalten, endogene Substrate des Enzyms jedoch während des Krankheitsverlaufs in zunehmendem Maße nicht mehr abgebaut werden.

So lassen sich aus den bisherigen Untersuchungen zwar Hinweise auf einen Defekt einer Neuraminidase im Nervengewebe der ML I und ML II Patienten finden, eindeutige Beweise hierfür jedoch nicht anführen. Bei den weiteren Studien über eine bisher ungeklärte Krankheit, der "Adult type neuronal storage disease" (ATNS) konzentrierten sich die Untersuchungen auf extraneuronales Gewebe (Fibroblasten, Leukozyten), da wir hofften, durch vergleichbare Ergebnisse an Zellkulturen eindeutigere Hinweise auf Organ- und Substratspezifitäten von Neuraminidasen zu erhalten.

2.1.3. Untersuchung der Neuraminidaseaktivität in Hautfibroblasten und Leukozyten eines Patienten mit "Adult type neuronal storage disease" (ATNS)

Die von Prof. Miyatake zur Untersuchung übersandten Zellkulturen wurden analog den für die Mucopolipidosen I und II beschriebenen Methoden (vgl. Abschn. 5) auf ihre Sialidaseaktivität getestet. Eine Unterscheidung zwischen wasserlöslichen und membrangebundenen Neuraminidasen war jedoch nicht möglich,

da sich die Enzymaktivitäten für beide verwendeten Substrate (Sialyllactit und Gangliosid G_{D1a}) zu 95 Prozent im 100.000 g Sediment wiederfanden. Neben den obengenannten Substraten hatte das Labor von Prof. Miyatake anschliessend auch das Gangliosid G_{M3} (vgl. S. 7) als Substrat eingesetzt und den Enzymtest nach unseren Angaben (vgl. Abschn. 5) durchgeführt. In Abb. 6 sind die Werte der Neuraminidaseaktivität gegenüber den Gangliosidsubstraten aufgeführt:

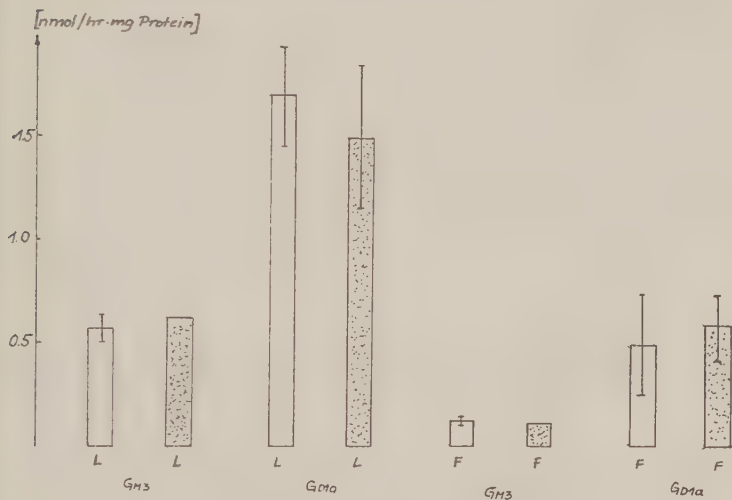


Abb. 6

Neuraminidaseaktivität gegenüber den Substraten G_{M3} und G_{D1a} in Leukozyten (L) und Fibroblasten (F) eines Patienten mit "Adult Type Neuronal Storage Disease"

□ Werte von Zellen gleichaltriger Kontrollpersonen (n=4)

▨ Werte des Patienten

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Wie aus der Abb. 6 zu sehen ist, liegen die Neuraminidaseaktivitäten für die beiden Gangliosidsubstrate im Bereich der Normwerte, also ist kein Defekt der gangliosidspaltenden Neuraminidase festzustellen. Der einzige Unterschied besteht in der höheren spezifischen Enzymaktivität der Leukozyten, die etwa das Dreifache der fibroblastenspezifischen Neuraminidaseaktivität erreicht.

Eine andere Situation bezüglich der Neuraminidaseaktivität ergab sich beim Einsatz des wasserlöslichen Substrates Sialyllactit. Die mit insgesamt vier Kontrollzellstämmen und den beiden pathologischen Zellen des Patienten erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 7 gezeigt:

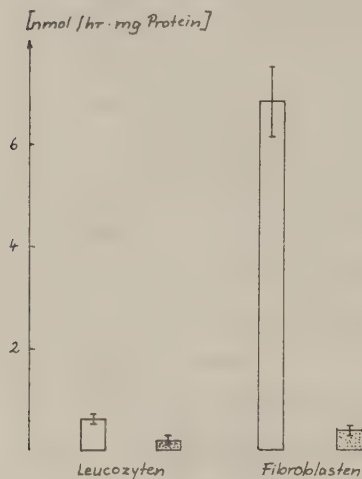


Abb. 7

Neuraminidaseaktivität mit Sialyllactit als Substrat in Leukozyten und Fibroblasten eines Patienten mit "Adult Type Neuronal Storage Disease" (ATNS)

□ Werte von Zellen gleichaltriger Kontrollpersonen

▨ Werte des Patienten

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Die Daten in Abb.7 zeigen deutlich, daß die Leukozyten des Patienten noch knapp die Hälfte der Neuraminidaseaktivität der Kontrollzellstämme erreichen. Wären bei dem Patienten mit ATNS nur Leukozyten untersucht worden, so hätte dies zu einer ähnlichen Interpretation wie bei den Studien zur ML I und II geführt: Es wäre ein partieller Defekt einer sialyllactitspaltenden Neuraminidase diagnostiziert worden. Die Einbeziehung von Fibroblasten in die Untersuchungen ermöglichte jedoch, bei dem ATNS Patienten den eindeutigen Defekt einer offenbar fibroblastenspezifischen Neuraminidase nachzuweisen;

Die Neuraminidaseaktivität des ATNS Patienten erreichte in Fibroblasten gegenüber dem Substrat Sialyllactit nur knapp sechs Prozent der Normalaktivität. Verglichen mit den Daten anderer Autoren (103,104,105,106,107,108,109) sind derart niedrige Neuraminidaseaktivitäten ein sicherer Hinweis auf das Vorliegen einer Sialidose Typ 2 (105), die klinisch durch eine relativ milde Form des Krankheitsverlaufes, das Auftreten von kirschroten Flecken am Augenhintergrund im präpubertärem Alter, im Erwachsenenstadium verstärkt einsetzenden Myoklonien und Bewegungsstörungen gekennzeichnet ist. Diese Symptome sind bei dem ATNS Patienten gegeben.

Patienten mit "Adult type neuronal storage disease" lassen sich nach den hier erstmals vorgestellten Untersuchungen als Träger einer Neuraminidasemangel-Erkrankung diagnostizieren.

4. Kurzzusammenfassung der pathobiochemischen Untersuchungen

(die Diskussion der Ergebnisse erfolgt in Abschn. 3.1. zusammen mit den enzymkinetischen Untersuchungen.)

- 1) Die Neuraminidasen der Kontrollfibroblasten spalten das Substrat Sialyllactit etwa 14 mal schneller als Gangliosidsubstrate (vgl. Abb. 6,7).
- 2) Das sialyllactitspaltende Enzym ist in Fibroblastenkulturen von Patienten mit ML I und ML II (105), jedoch ebenfalls bei dem hier untersuchten Patienten mit ATNS, defekt (Abb.7).
- 3) Die ATNS Fibroblasten besitzen gegenüber Sialyllactit noch eine geringe enzymatische Restaktivität, die auf die (nicht defekte) gangliosidsplattende Neuraminidase zurückzuführen sein dürfte.
- 4) Leukozyten von Kontrollpersonen tragen eine hohe gangliosidsplattende Neuraminidaseaktivität, so daß in Leukozyten des ATNS Patienten dieses Enzym für eine höhere Restaktivität gegenüber Sialyllactit verantwortlich ist.
- 5) Hirngewebe ist besonders reich an der gangliosidsplattenden Neuraminidase (vgl. Abb. 6 mit Tab. 2), die in Fibroblasten nur etwa 10 Prozent der Aktivität dieses Enzyms im Hirngewebe erreicht. Bei der Untersuchung

der ML I wurden keinerlei Hinweise auf eine verminderte Enzymaktivität gegenüber Sialyllactit gefunden. Im Rahmen der Meßgenauigkeit dürfte das wasserlösliche Substrat also im wesentlichen von der gangliosidspaltenden Neuraminidase abgebaut worden sein, ein möglicher Defekt einer sialyllactit-spezifischen Neuraminidase ist unter diesen Umständen im Hirngewebe nicht eindeutig nachweisbar.

Im Hirngewebe des ML II Patienten war ebenfalls kein deutlicher Enzymdefekt festzustellen. Neuere Untersuchungen bei dieser Krankheit haben ergeben, daß die ML II (oder I-cell disease) offenbar nicht zu den Sialidosen (105) zu rechnen ist, da sowohl in Fibroblasten als auch in dem hier untersuchten Nervengewebe neben der Neuraminidase noch andere, lysosomale Enzyme in ihrer Aktivität vermindert sind. Es wird vermutet, daß multiple Störungen bei der Phosphorylierung mehrerer Proenzyme (110, 111a) zu einer generellen Erniedrigung der enzymatisch aktiven Hydrolasen in den intrazellulären Verdauungsorganellen, den Lysosomen, führen (111).

Das Fehlen einer Gangliosidspeicherung im Hirngewebe der Patienten mit Mucopolidose I und II kann als Hinweis gewertet werden, daß der Abbau der Oligosialylganglioside nicht von der fibroblastenspezifischen, lysosomalen Neuraminidase, sondern der im Nervengewebe weit verbreiteten Neuraminidase der Plasmamembran eingeleitet wird. Diesem membrangebundenen Enzym ist das folgende Kapitel gewidmet.

2.2. Enzymkinetische Untersuchungen

2.1. Ausgangspunkt

Die bisherigen Untersuchungen über Neuraminidasedefekte bei den Mucopolysaccharidosen I und II stützten sich auf parallele Studien über die Eigenschaften des Enzyms in seiner natürlichen Umgebung, den neuronalen Membranen. Es wurde festgestellt, daß Sialidosen nicht generalisiert auftreten, sondern bisher nur in extraneuronalen Zellpopulationen mit wasserlöslichen Substraten eindeutig nachgewiesen werden konnten. In neuronalen Geweben sind die bevorzugten Substrate der Neuraminidase der Plasmamembran jedoch membrangebundene Oligosialylganglioside mit endständiger Sialsäure. Daher wurde im Folgenden der Mechanismus der Wechselwirkung zwischen diesem Enzym und den Gangliosiden näher untersucht. Die sich bisher aus meiner Diplomarbeit ergebenden Vorstellungen über diesen Mechanismus sind in Abb. 8 c erläutert:

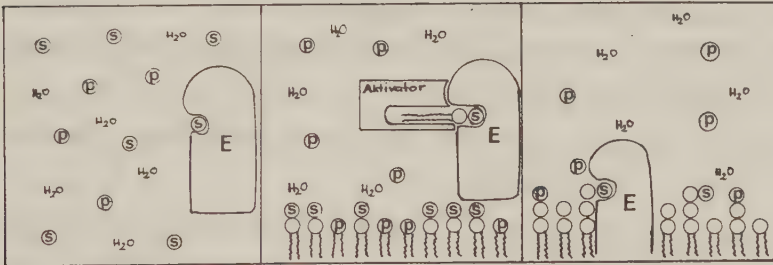


Abb. 8 Schematische Darstellung der Enzym-Substrat-Wechselwirkung

S = Substratmolekül; E = Enzymprotein; P = Produkte nach der Substratspaltung

Für die Ermittlung der katalytischen Aktivität eines Enzyms wird in der Regel die Umsatzgeschwindigkeit des entsprechenden Substrates bestimmt. Im Falle löslicher, solvatisierter Enzymproteine und ihren molekular gelösten Substraten (Abb. 8 a) ist nach der Theorie von Michaelis und Menten (112) die Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes als der

langsamste Reaktionsschritt geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion. Bei löslichen, solvatisierten Enzymproteinen und deren membran- gebundenen Substraten (Abb. 8 b) scheinen an der geregelten Kontaktvermittlung nicht-enzymatisch wirkende Aktivatorproteine beteiligt zu sein. Nachdem das Vorkommen dieser Aktivatoren zunächst von Jatzkewitz und Mitarbeitern (113) für die Spaltung der Sulfatide durch die Sulfatase A nachgewiesen werden konnte, ließ sich ihre physiologische Notwendigkeit vor kurzem an einer speziellen Variante der G_{M2} - Gangliosidose, einer Glycolipidspeicherkrankheit, deutlich machen (114).

Die dritte Möglichkeit, die den Abbau membranständiger Substrate durch membrangebundene Enzyme beschreibt (Abb. 8 c), tritt bei der membrangebundenen Neuraminidase und ihren Substraten, den Oligosialylgangliosiden, auf. Da Enzym und Substrate nach früheren Untersuchungen (23, 24) nebeneinander in derselben Membran vorliegen, stellen sich für das Verständnis des Membranmetabolismus folgende Fragen:

- 1) Unter welchen Bedingungen können Substrat und Enzym überhaupt nebeneinander existieren?
- 2) Welche elektrostatischen (z.B. Ionenstärke) oder pH-Bedingungen regulieren den Gangliosidabbau?
- 3) Wie werden die Abbauraten membrangebundener Substrate durch Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der umgebenden Membran verändert?

Als Studienmodell zur Klärung dieser Fragen wurde eine mehrfach vorgereinigte Mikrosomenfraktion des Kalbhirns gewählt, die durch mehrmaliges Waschen mit einem Puffer niedriger Ionenstärke (10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2) weitgehend von wasserlöslichen Substraten (z.B. Sialyloligosacchariden) und wasserlöslichen Formen der Neuraminidase (vgl. Abschn. 5 und Tab. 1 S. 5) befreit war. An dieser Mikrosomenfraktion hatten Untersuchungen von Sandhoff und Mitarbeitern (115), sowie eigene Arbeiten (84, 85) ergeben, daß sowohl endogene als auch zugesetzte Ganglioside in Anwesenheit bestimmter Detergenzien (z.B. Triton X-100) aber auch unter

hohen Drucken der Anästhesiegase Xenon und Lachgas, oder jenseits der klinisch verwendeten Konzentration des leichtflüchtigen Anästhetikums Halothan offenbar schneller durch das membrangebundene Enzym abgebaut werden. Nichtanästhetisch wirkende Gase wie Wasserstoff, Helium oder Stickstoff hatten dagegen keine Wirkung.

Die Gründe für dieses ungewöhnliche Verhalten des Gangliosidabbaus durch die membrangebundene Neuraminidase konnten erst nach parallelen Studien mit einem wasserlöslichen Substrat des Enzyms, dem radioaktiven Derivat des Trisaccharids Sialyllactose, und der notwendigen Veränderung eines bestehenden Testverfahrens (116) zur genauen Bestimmung der Umsatzraten dieses wasserlöslichen Substrates gefunden werden: Danach wurden durch die oben genannten Anästhetika nicht die Enzymaktivität selbst, sondern membranspezifische Parameter, wie die Beweglichkeit der Lipide - einschließlich der Gangliosidsubstrate in der Membranebene - verändert. Es ließ sich die allgemeine Regel aufstellen, daß eine Erhöhung der Umsatzraten des Gangliosidsubstrates (z.B. durch Anästhetika) unter identischen Bedingungen zu einer unveränderten oder verminderten Umsatzrate an wasserlöslichem Substrat führt. Diese Beobachtung ist eng mit den unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der verwendeten Substrate, Sialyllactit und Gangliosid G_{D1a} verbunden (Abb. 9)

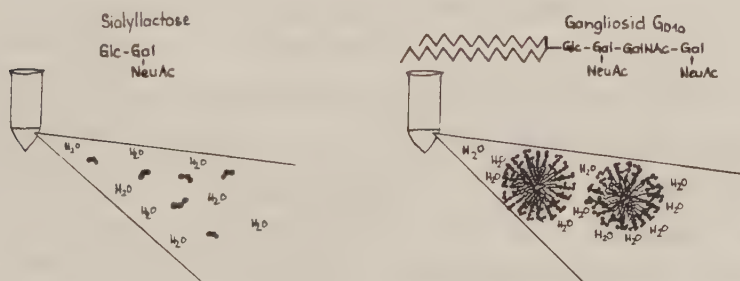


Abb. 9 Schematischer Vergleich der Lösungseigenschaften der Substrate Sialyllactit (a) und des Gangliosids G_{D1a} (b); vgl. hierzu Text

Im Gegensatz zu Oligosacchariden (Abb. 9 a) liegen Ganglioside in wässrigen Systemen (Abb. 9 b) nicht monomolekular gelöst, sondern als sog. "Mizellen" vor, wobei sich nach neueren Untersuchungen bisher noch keine kritische Mizellbildungs-Konzentration bestimmen ließ (59). Diese Mizellen sind im Inneren mit den hydrophoben Fettsäurebereichen der Ganglioside ausgefüllt; sie unterscheiden sich also von Lipiden mit kleineren, polaren Köpfen (z.B. Lecithin), die doppelschichtige Liposomen ausbilden (Abb. 10).

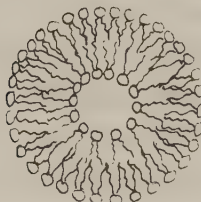
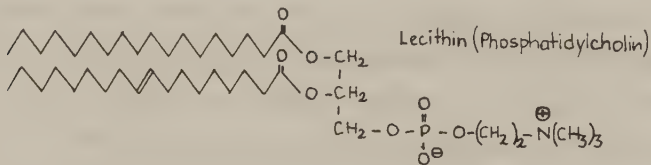


Abb. 10 Liposom aus Lecithinmolekülen (schematisch)

Diese Mizellen zeigten, anders als Oligosaccharide, eine hohe Affinität zu Mikrosomenmembranen (84, 85, 86), so daß Substrate der Neuraminidase mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften als "Sonden" für Veränderungen der katalytischen Aktivität eines membrangebundenen Enzyms und strukturellen Veränderungen der Membranphase verwendet werden können. Diese strukturellen Änderungen können einerseits das Enzymprotein selbst beeinflussen (Substrat: Sialyllactit) oder die Wechselzahl (=Substratkontakt mit Enzym/Zeiteinheit) eines membrangebundenen Substrates mit dem Enzym in der Lipidphase durch diffusionsabhängige Parameter beeinträchtigen (Substrat: Gangliosid G_{D1a}).

Da bisher Versuche zur Reinigung der membrangebundenen Neuraminidase an der Labilität des Enzyms in Detergenslösungen scheiterten, sollte das Enzym zunächst in seiner natürlichen Umgebung genauer studiert werden, um das

bereits erwähnte Konzept (siehe S.10) der Membranenzymologie zu überprüfen. Hierzu war der Einfluß von Fluiditätsveränderungen in der Mikrosomenmembran - hervorgerufen durch bestimmte Lipide (z.B. Lysolecithin) oder Änderungen der Ionenstärke sowie Anästhetika (u.a. Halothan bei klinisch wirksamen Konzentrationen) genauer zu untersuchen. Die dabei verwendeten Methoden lassen sich im wesentlichen in drei Gruppen einteilen:

A) Enzymaktivitätsmessungen

Die Neuraminidaseaktivität in Kalbshirnmikrosomen wurde durch Messung der Umsatzgeschwindigkeit der radioaktiv-markierten Substrate G_{D1a} und Sialyllactit bei unterschiedlichen pH- und Ionenbedingungen bestimmt.

B) Mikroviskositätsmessungen

Die Fluoreszenzpolarisation P des hydrophoben Membranmarkers 1.6.-Diphenyl-1.3.5.-Hexatrien (DPH) kann nach (117) als Maß für Veränderungen der Membranfluidität herangezogen werden ($1/P \sim \text{Fluidität}$). Durch Versetzen des Inkubationsansatzes mit allgemeinen Anästhetika oder bestimmten Reinlipiden, Markierung der Membransuspension mit DPH und temperaturabhängigen Untersuchungen der Fluoreszenzdepolarisation in einem Mikroviskosimeter (Typ MV Ia der Fa. Elscint, Wiesbaden) sind Hinweise auf fluiditätssteigernde oder -senkende Eigenschaften der eingesetzten Substanzen zu erhalten. Soweit Vergleichsdaten in der Literatur bekannt sind, lassen sich sogar quantitative Beziehungen ableiten (87).

C) Bindungsstudien

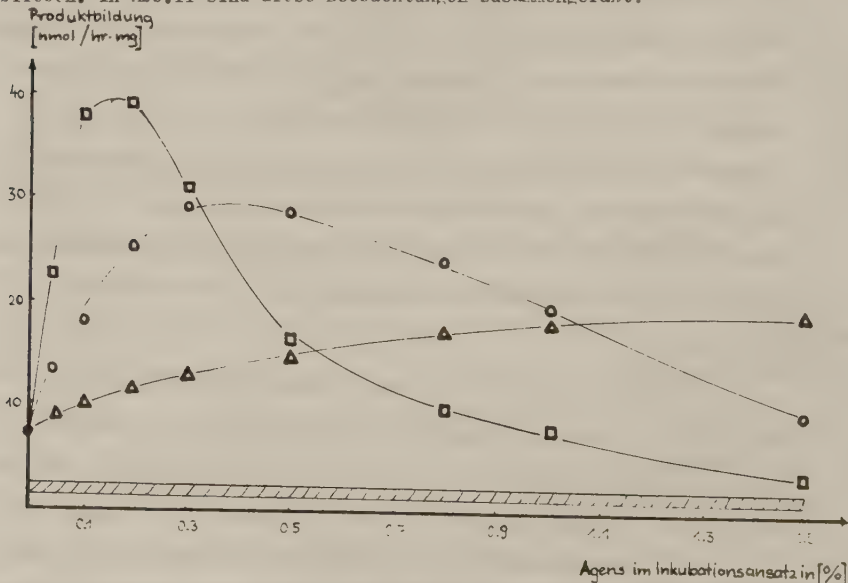
Da über die Bindungseigenschaften exogen zugesetzter Ganglioside an neuronale Membranen zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine Literaturdaten vorlagen, mußte überprüft werden, wie Glycolipide aus der mizellaren Form mit dem membrangebundenen Enzym in Kontakt treten können. Deshalb wurden radioaktiv-markierte Substratmizellen (Gangliosid G_{D1a}) und andere Ganglioside ohne Substrateigenschaften unter verschiedenen Bedingungen mit Mikrosomen vorinkubiert. Nach anschließender Zentrifugation sowie Waschen der Präparationen in neutralen Pufferlösungen ließ sich durch Lipidextraktionsstudien das Verhältnis von eingelagerten zu nicht-gebun-

denen Glycolipiden bestimmen. Diese Untersuchungen sollten Hinweise auf die Übertragbarkeit der in vitro Bedingungen auf intakte biologische Membransysteme erbringen.

Methodische Einzelheiten der durchgeführten Versuche sind in Abschnitt 5. (Material und Methoden) dieser Arbeit ausführlich erläutert.

2.2.2. Wirkung von Triton X-100, Halothan und Diäthyläther auf die Aktivität der membrangebundenen Neuraminidase

Zu Beginn der Untersuchungen wurde festgestellt, daß geringe Mengen des Detergens' Triton X-100 und die Anästhetika Halothan, Chloroform oder Diäthyläther den Abbau des Gangliosidsubstrates G_{D1a} stimulieren konnten, die Umsatzrate des wasserlöslichen Substrates Sialyllactit jedoch unbeeinflusst blieben. In Abb.11 sind diese Beobachtungen zusammengefaßt:



Der Abbau des Gangliosidsubstrates G_{D1a} wird nach den in Abb. 11 gezeigten Ergebnissen durch geringe Mengen des nichtionischen Detergens' Triton X-100, Halothan oder Diäthyläther stimuliert, während der Abbau von Sialyllactit unbeeinflusst bleibt. Dies läßt sich nicht nur bei Sialyllactitkonzentrationen von 0.1 mM sondern auch bei höheren Konzentrationen (bis zu 2 mM) zeigen. Allerdings ließ sich die Konzentration des Gangliosidsubstrates nicht beliebig erhöhen, da mit diesem Substrat bereits bei Konzentrationen ab 0.15 mM unter den gewählten Bedingungen eine Substrathemmung zu beobachten war (84). An anderer Stelle wurde bereits gezeigt, daß sich auch die enzymatische Hydrolyse endogener, lipidgebundener Substrate der membrangebundenen Neuraminidase durch die verwendeten Agenzien stimulieren läßt (115). Höhere Agenskonzentrationen führen offenbar zu einer irreversiblen Denaturierung des Enzymproteins, da ein nachträgliches Herabsetzen der Agenskonzentration (z.B. durch Verdünnen der Enzympräparation mit einem 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.2 oder Dialyse gegen dest. Wasser bei 4°C) keinerlei Hinweise auf eine Reaktivierung der katalytischen Aktivität des Enzyms gegenüber beiden Substraten erbringen konnten.

Diese und im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigte Ergebnisse (vgl. Abschnitte 2.2.4. und 2.2.6. sowie 2.2.11.) deuteten darauf hin, daß für die in Abb. 11 gezeigten Meßwerte nicht unterschiedliche Isoenzyme verantwortlich waren. Vielmehr wurden andere Membranparameter (wie z.B. die Membranfluidität, Diffusionsraten des membrangebundenen Substrates) in Betracht gezogen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde zur Bestimmung der Membranfluidität die Methode der Fluoreszenzpolarisation gewählt. Die Brauchbarkeit dieser Methode mußte jedoch zunächst an synthetischen Lipidliposomen aus Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin und Sphingomyelin (118) getestet werden. Wie aus den in Abb. 12 (siehe S. 34) gezeigten Daten zu sehen ist, lassen sich Liposomen aus Sphingomyelin mit steigenden Temperaturen fluidisieren. Ähnliche Fluidisierungen sind aber auch durch Zusatz geringer Mengen Halothan zu bewirken, denn bei gleicher Temperatur sind unter Zusatz steigender Halothanmengen Senkungen der Mikroviskosität, d.h. zunehmende Fluidisierungen feststellbar.

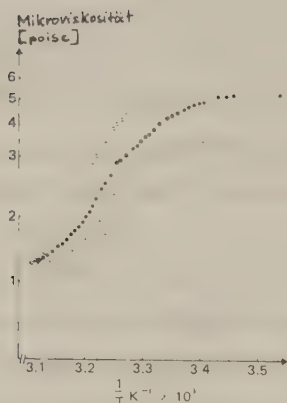


Abb. 12

Temperaturabhängiger Mikroviskositätsverlauf in Liposomen aus Sphingomyelin

Die Testmischungen von je 2 ml enthielten 1 mg Sphingomyelin, 2 nmol 1.6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien in 10 mM Phosphatpuffer pH=7.2

- ○ ohne Zusätze
- ● mit 0.05 % Halothan im Ansatz
- △ △ mit 0.08 % Halothan im Ansatz
- □ mit 0.1 % Halothan im Ansatz

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Am Wendepunkt der in Abb. 12 gezeigten Kurven findet in den Liposomen eine Phasenumwandlung statt. Diese Phasenumwandlung von einem semi-kristallinen in einen semi-fluiden Zustand stellt ein Charakteristikum von Reinlipiden dar(119). Im Gegensatz dazu sind biologische Membranen aus vielen verschiedenen Lipiden mit unterschiedlichen, nahe beieinanderliegenden Phasenumwandlungstemperaturen aufgebaut, die mit der hier verwendeten Methode nicht mehr identifizierbar sind. Als Beispiel ist in Abb. 13 das Fluidisierungsprofil von Mikrosomen des Kalbhirns gezeigt, die mit unterschiedlichen Mengen Halothan (Abb. 13 a) oder Diäthyläther (Abb. 13 b) behandelt wurden (siehe S. 35)

Ähnliche wie die in Abb. 13 gezeigten Ergebnisse lassen sich auch mit anderen Anästhetika (z.B. Chloroform, Acetessigester, Benzylalkohol; Daten nicht auf-

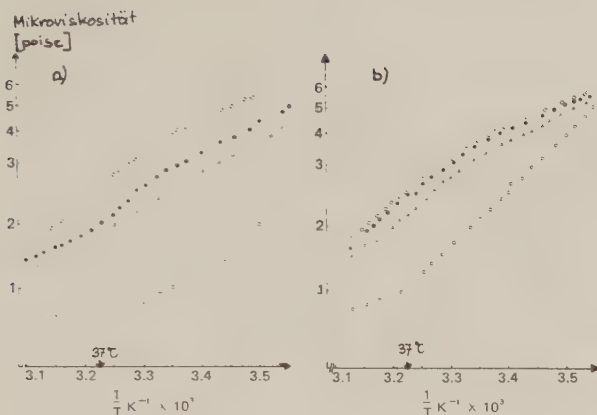


Abb. 13 a,b

Temperaturabhängiger Mikroviskositätsverlauf in Kalbshirnmikrosomen

Die Testmischungen von je 2 ml enthielten 1 mg Mikrosomenprotein, 2 mmol 1.6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien in 10 mM Phosphatpuffer pH=7.2

a)	b)
o o ohne Zusätze	o o ohne Zusätze
• • mit 0.05 % Halothan im Ansatz	• • mit 0.1 % Diäthyläther im Ansatz
△ △ mit 0.1 % Halothan im Ansatz	△ △ mit 1.0 % Diäthyläther im Ansatz
□ □ mit 0.3 % Halothan im Ansatz	□ □ mit 3.0 % Diäthyläther im Ansatz
(zur Methodik vgl. Abschn. 5)	

geführt) erhalten. Allerdings sind die zur Messung deutlicher Fluiditätsveränderungen notwendigen Konzentrationen um Zehnerpotenzen oberhalb der klinisch verwendeten Anästhesiekonzentration einzusetzen. Eine Ausnahme schien bei unseren Untersuchungen jedoch das Anästhetikum Halothan zu machen. Die in Abb. 13 a mit nur 0.05 % Halothan im Inkubationsansatz gezeigte Kurve ließ vermuten, daß genauere Messungen bei einer bestimmten Temperatur (37°C) mit noch geringeren, d.h. klinisch relevanten Halothankonzentrationen sowohl Veränderungen der Membrabfluidität als auch des Gangliosidabbaus nachweisbar erscheinen ließen. Da Halothan eine hochflüchtige Flüssigkeit darstellt, mußte bei den folgenden Untersuchungen auf höchste Dichtheit der Inkubationsgefäße geachtet werden.

2.2.3. Stimulierung des Gangliosidabbaus durch klinische Halothankonzentrationen

In Zusammenarbeit mit R. Pellkofer aus unserer Arbeitsgruppe wurde versucht, die Stimulierung des Gangliosidabbaus in Mikrosomen auch bei klinischen Konzentrationen des Anästhetikums Halothan (klinische Halothankonzentration ≤ 5 Vol% in der Gasphase) nachzuweisen. Da in der Literatur widersprüchliche Angaben über den Verteilungskoeffizienten dieses Anästhetikums zwischen Membran- Puffer- und Gasphase veröffentlicht waren (120, 121), wurden mit ^{14}C -markierten Halothanpräparationen diese Koeffizienten für die Mikrosomenmembranen neu bestimmt (vgl. Abschn. 5 und (88)). Die aus diesen Vorversuchen resultierenden Mengen an Halothan (vgl. Abschn. 5) wurden dann in beiden Testsystemen, den Fluiditätsmessungen und den enzymatischen Bestimmungen, eingesetzt. In Abb. 14 sind die Ergebnisse zusammengefaßt:

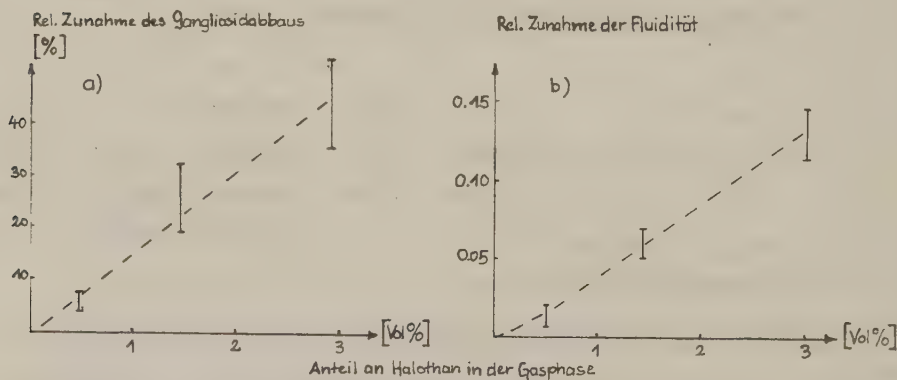


Abb. 14 Vergleich zwischen a) den Abbauraten des Gangliosids G_{D1a} durch die membrangebundene Neuraminidase und b) der Fluiditätsveränderung in Mikrosomen in Gegenwart steigender Mengen Halothan

- a) die Inkubationsmischung von 100 μl enthielt 10 nmol $[^3\text{H}]G_{D1a}$, 100 μg Mikrosomenprotein, 15 μl 0.4 M Na-Acetatpuffer (pH=4.2). Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C.
- b) die Inkubationsmischung von 200 μl enthielt 200 μg Mikrosomenprotein, 0.5 nmol DPH in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH=7.2). Die Fluoreszenzdepolarisation wurde je Testansatz 2 Minuten nach Einstellung des Gleichgewichtes für 30 Sek bei 37°C gemessen. Die Fluiditätszunahme ist in Einheiten nach (88) angegeben.

zur Methodik vgl. Abschn. 5

Nach den in Abb. 14 a,b gezeigten Daten lassen sich also sowohl die Umsatzraten von G_{D1a} als auch die Fluidität der Enzympräparation (Mikrosomen) durch klinische Halothankonzentrationen in der Gasphase der Inkubationsansätze steigern. Quantitativ sind die Ergebnisse jedoch nur mit folgenden Einschränkungen korrelierbar:

- 1) Wegen des methodisch aufwendigen Versuchablaufs wurden nur insgesamt 2 Testansätze mit je 4 Doppelbestimmungen durchgeführt.
- 2) Die Standardabweichung bei den hier durchgeführten Versuchen lag bei 20 Prozent gegenüber sonst beobachteten 5 bzw. 3 Prozent (vgl. Abschn. 5). Es müssen deshalb Fehler beim Pipettieren sehr kleiner Mengen an Halothanlösung ($\leq 3 \mu l$) aufgetreten sein.
- 3) Aus den Legenden von Abb. 14 ist zu entnehmen, daß die Bestimmung der Enzymaktivität bei $pH=4,2$, die Fluiditätsmessung jedoch bei $pH=7,2$ durchgeführt wurden. Korrekterweise sollten beide Versuche bei identischen pH -Bedingungen durchgeführt werden, dies war aus folgenden Gründen nicht möglich:
 - a) unterhalb von $pH=5$ sinkt die Fluoreszenzintensität des Membranmarkers DPH aus physikalische Gründen (122) unter die vom Gerätehersteller festgelegte Toleranzmarke (118), so daß Untersuchungen zur pH -Abhängigkeit der Membranfluidität nicht durchgeführt werden konnten.
 - b) Andererseits liegt das pH -Optimum der enzymatischen Katalyse bei $pH=4$ (vgl. Abschn. 2.2.6.). Beim für Fluiditätsmessungen notwendigen pH -Wert von $7 \pm 0,5$ sind die Abbauraten der Substrate zu gering, um mit der verwendeten Methode noch sicher nachgewiesen werden zu können.

Trotz dieser Einschränkungen sind die gezeigten Daten als Argumente für die aufgestellte Hypothese zu werten, da analoge Messungen an einem membran-bundenem Enzym mit neutralem pH -Optimum und seinem ebenfalls membrangebundenem Substrat (Sphingomyelinase und Sphingomyelin) inzwischen zu ähnlichen Untersuchungsergebnissen wie den hier gezeigten geführt haben(88).

Da die Abbauraten des wasserlöslichen Substrates Sialyllactit bei den im vorangegangenen Abschnitt durchgeführten Versuchen nicht in meßbarer Weise beeinflußt wurden, sollte untersucht werden, ob Substanzen existieren, die den Abbau beider Substrate in gleichsinniger Weise beeinflussen können. Hierfür kommen vor allem endogene membrangebundene Lipide in Frage, die in die gleiche Membranphase wie die membrangebundene Neuraminidase eingelagert sind. Eigene, frühere Untersuchungen hatten Hinweise auf die Existenz endogener Inhibitoren des Enzyms erbringen können (84), über die im folgenden Abschnitt bezüglich ihrer Wirkungsweise gegenüber beiden Substraten berichtet wird.

2.2.4. Aktivität der membrangebundenen Neuraminidase in Gegenwart verschiedener Inhibitoren

Wie bereits erwähnt (Abschn. 2.2.2.), läßt sich zwar der Gangliosidabbau, nicht jedoch der Umsatz von Sialyllactit durch hohe Lachgasdrucke stimulieren. Als Spaltprodukte der enzymatischen Reaktion entstehen im Falle des Gangliosids G_{D1a} die N-Acetylneuraminsäure und das Monosialylgangliosid G_{M1} . Dieses Gangliosid kann zwar von der Neuraminidase nicht mehr gespalten werden, da es keine endständige Neuraminsäure besitzt, es bleibt jedoch als Glycolipid membrangebunden und könnte deshalb die katalytische Aktivität des Enzyms beeinträchtigen. Deshalb wurden Inkubationsansätze mit steigenden Mengen an G_{M1} versetzt, inkubiert und hinsichtlich der Abbauraten von Sialyllactit und G_{D1a} verglichen. In den Abb. 15 und 16 (siehe S. 39, 40) sind die Ergebnisse zusammengefaßt: Es ließ sich zeigen (Abb. 15), daß das Gangliosid G_{M1} in Konzentrationen von ≤ 2 mM den Gangliosidabbau hemmt. Ebenso ließ sich eine Hemmung der Sialyllactitspaltung (Abb. 16) zeigen, wobei aus dieser Darstellung hervorgeht, daß die Enzymaktivität selbst durch Lachgas - ähnlich wie die Aktivität anderer membrangebundener Enzyme, die wasserlösliche Substrate umsetzen (z.B. 5'-Nucleotidase, Na,K-ATPase, Adenylat-Cyclase) - gehemmt wird (115). Allerdings werden beide Substrate in unterschiedlichem Maße

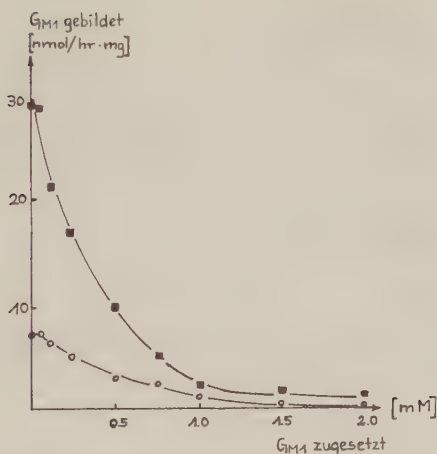


Abb. 15

Hemmung der membrangebundenen Neuraminidase durch das Gangliosid G_{M1} . Als Substrat ist G_{D1a} eingesetzt.

Die Inkubationsansätze von $100\mu\text{l}$ enthielten $10\text{ nmol } [^3\text{H}]G_{D1a}$, $100\mu\text{g}$ Mikrosomenprotein, $15\mu\text{l}$ 0.4 M Na-Acetatpuffer $\text{pH}=4.2$ und steigende Mengen an G_{M1} . Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C .

○—○ Normalbedingungen

■—■ 30 atm Lachgas

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

von der Hemmung durch das Gangliosid G_{M1} betroffen. Diese Unterschiede in der inhibitorischen Wirksamkeit von G_{M1} stellt wieder die Frage nach dem Auftreten bisher nicht erkannter membrangebundener Isoenzyme der Neuraminidase zur Diskussion. Auch Untersuchungen mit anderen Glycolipiden sowie wasserlöslichen Oligosacchariden (siehe Tab. 6, S.41) konnten diese Frage nicht eindeutig entscheiden: Offenbar zeigen alle wasserlöslichen Inhibitoren einen schwachen, alle lipidgebundenen Inhibitoren einen stark hemmenden Effekt im enzymatischen Test mit G_{D1a} als Substrat. Nur angedeutet ist dieser Gang der inhibitorischen Wirkung im Test mit Sialyllactit (Tab. 6).

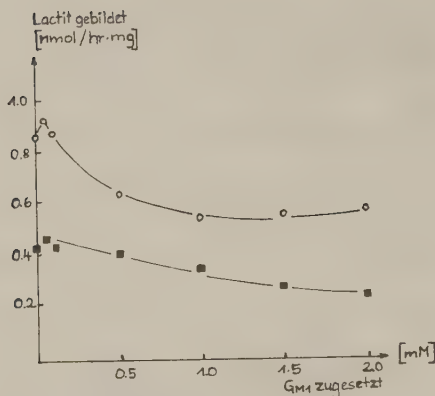


Abb. 16

Hemmung der membrangebundenen Neuraminidase durch das Gangliosid G_{M1} . Als Substrat ist Sialyllactit eingesetzt.

Die Inkubationsansätze von $100\mu\text{l}$ enthielten $10\text{ nmol } [^3\text{H}]$ Sialyllactit, $400\mu\text{g}$ Mikrosomenprotein, $15\mu\text{l}$ 0.4 M Na-Acetatpuffer $\text{pH}=4.2$ und steigende Mengen an G_{M1} . Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C .

○—○ Normalbedingungen

■—■ 30 atm Lachgas

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Da alle Inhibitoren in gleicher Weise vorbehandelt wurden (vgl. Abschn. 5.2.), sind auch Unterschiede in der Verfügbarkeit der zugesetzten Substanzen unter Berücksichtigung ihrer physiko-chemischen Unterschiede zu vernachlässigen. In diesen Unterschieden scheint jedoch einer der Hauptgründe für die inhibitorische Wirksamkeit zu liegen. So hatten frühere Untersuchungen ergeben, daß das Glycolipid G_{A2} , das neuraminsäurefreie Derivat des Gangliosids G_{M2} , nur den Abbau von G_{D1a} nicht jedoch von Sialyllactit hemmen konnte (84). Nach Studien zur Bestimmung der Hemmkonstante dieses Glycolipids nach der Methode von Lineweaver und Burk (123) war das Glycolipid G_{A2} als kompetitiver Inhibitor des Gangliosidabbaus anzusehen, obwohl keine Hemmung der Si-

Inhibitor (Konz.: 0.6 mM)	$[^3\text{H}]\text{G}_{\text{D1a}}$ als Substrat (0.1 mM)		$[^3\text{H}]\text{Sialyllactit}$ als Substrat (0.1 mM)	
	Normalbedingungen	unter 30 atm N_2O	Normalbedingungen	unter 30 atm N_2O
ohne	6.8	29.6	0.85	0.42
NeuAc	6.8	29.6	0.7	0.48
des- $\text{G}_{\text{M1}}^{\text{xxx}}$	6.8	28.5	1.0	0.48
Sialyllactose	6.5	29.6	—	—
G_{A2}	5.4	22.2	1.0	0.48
G_{M2}	3.9	15.9	0.66	0.44
G_{M1}	2.3	7.2	0.61	0.35
G_{D1a}	—	—	0.55	0.22

Die angegebenen Aktivitäten sind normiert auf nmol/hr/mg Protein

^{xx} Standardabweichung= 5% ^{xx} Standardabweichung= 3%

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

^{xxx} des- G_{M1} ist das Ceramidfreie, wasserlösliche Derivat des Gangliosids G_{M1} . Es wurde von Dr. W.

Ziegler zur Verfügung gestellt.

allyllactitspaltung beobachtet worden war. Neben einer Wechselwirkung der Neuraminsäurereste von Glycolipiden (wie z.B. G_{M1} oder G_{M2}) oder Sialyloligosacchariden (wie z.B. Des- G_{M1}) mit dem aktiven Zentrum des membran- gebundenen Enzyms mußte also eine weitere - hydrophobe - Bindungsstelle postuliert werden, durch die die katalytische Aktivität des Enzyms reguliert werden kann. An diese hydrophobe Bindungsstelle könnte sich also das neuraminsäurefreie Glycolipid G_{A2} angelagert haben. Eine weitere Beobachtung spricht für diese Annahme:

Im enzymatischen Test mit Sialyllactit (Tab. 6) ist das nicht radioaktiv- markierte Gangliosid G_{D1a} als Inhibitor eingesetzt worden. Da nun zwei Substrate um Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms konkurrieren, muß die Umsatzrate an Sialyllactit mit diesem Inhibitor am stärksten abgesenkt werden, wenn es sich um ein Enzymprotein handelt. Dies stimmt mit den vorgelegten Daten überein. Andererseits hemmt Sialyllactose den G_{D1a} - Abbau nur schwach, weil bei der vorgegebenen Sialyllactosekonzentration vor allem das Gangliosidsubstrat an die Membranen gebunden (85) und vom Enzym gespalten wird. Neben diesen physiko-chemischen Unterschieden der Inhibitoren sprechen für diese Interpretation auch enzymkinetische Daten zur Substratspezifität der membrangebundenen Neuraminidase, die in den vergangenen Jahren in der Literatur veröffentlicht wurden: Für das Gangliosidsubstrat G_{D1a} sind je nach Herkunft der Enzympräparation und den gewählten Testbedingungen Werte für "scheinbare" Michaeliskonstanten zwischen $K_M = 4.8-128 \mu M$, für Sialyllactose Werte von $K_M = 0.7 - 2 \text{ mM}$ angegeben worden (87).

Die Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren scheint deshalb im wesentlichen von der Substrat-und Inhibitorspezifität des Enzyms und nicht vom Auftreten von Isoenzymen herzurühren. Nicht geklärt werden konnte, ob die eingesetzten Inhibitoren auch die Membranfluidität bei den im enzymatischen Test verwendeten Konzentrationen herabsetzen können. Trotz mehrfacher Versuchsansätze war es nicht möglich, signifikante Änderungen der Fluoreszenzpolarisation mit DPH als Membranmarker zu registrieren.

Inzwischen haben andere Untersuchungen zeigen können, daß Glycolipide mit zunehmendem Anteil an Neuraminsäure die Fluidität künstlicher Cholesterin/Lecithin-Liposomen herabsetzen können (124). Dies beruht jedoch offenbar auf Mechanismen, die auf elektrostatische Wechselwirkungen der Neuraminsäurereste im Zuckeranteil der Ganglioside zurückzuführen sind, so daß mit dem hydrophoben Membranmarker DPH, der nur Veränderungen im Fettsäurebereich von Lipidschichten registrieren kann, keine Aussagen über Fluiditätsveränderungen an der Membran-Puffer-Grenzphase zu erhalten sind. In diesem Bereich befinden sich die kovalent gebundenen Neuraminsäurereste der Ganglioside, die sehr unterschiedlich auf veränderte Puffer- und Ionenbedingungen reagieren, wie im folgenden Abschnitt (Abschn. 2.2.5.) gezeigt werden wird.

Die bereits angesprochenen Schwankungen bei der Bestimmung von Michaeliskonstanten sowie divergierende Angaben über das pH-Optimum der membrangebundenen Neuraminidase waren der Anlaß zu den folgenden Untersuchungen. Nach Studien von G. Scheel (87) sowie eigenen Messungen liegen die "scheinbaren" K_M -Werte bei den verwendeten Kalbshirnmikrosomen für das Substrat G_{D1a} bei $50 \mu M$, für das Substrat Sialyllactit bei $1 mM$. Um unter enzymkinetisch definierten, linearen Bedingungen zu messen, wird im folgenden Abschnitt über die Puffer- und Ionenabhängigkeit der Spaltung von G_{D1a} ($0.1 mM$) und Sialyllactit ($2 mM$) durch die membrangebundene Neuraminidase berichtet.

2.2.5. Puffer- und Ionenabhängigkeiten der membrangebundenen Neuraminidase-Aktivität

Bei der Präparation von Kalbshirnmikrosomen war bereits früher aufgefallen, daß je nach Alter der Tiere unterschiedliche Neuraminidaseaktivitäten gefunden werden können. Allgemein waren dabei die Hirne junger Tiere bezüglich des Neuraminidasegehaltes gegenüber beiden hier verwendeten Substraten aktiver als die älterer Tiere. Das Kalb der im folgenden Abschnitt gezeigten

Ergebnisse war bei der Autopsie sieben Wochen alt. Das Gehirn wurde wie üblich vorbehandelt (vgl. Abschn. 5.), die einzelnen Waschschrirte erfolgten jedoch entweder in Gegenwart von Ringer-Lösung (Mikrosomen 1), physiologischer Kochsalzlösung (Mikrosomen 2) oder 10 mM Tris/HCl-Puffer (Mikrosomen 3). Alle Waschlösungen besaßen einen pH-Wert von 7.2.

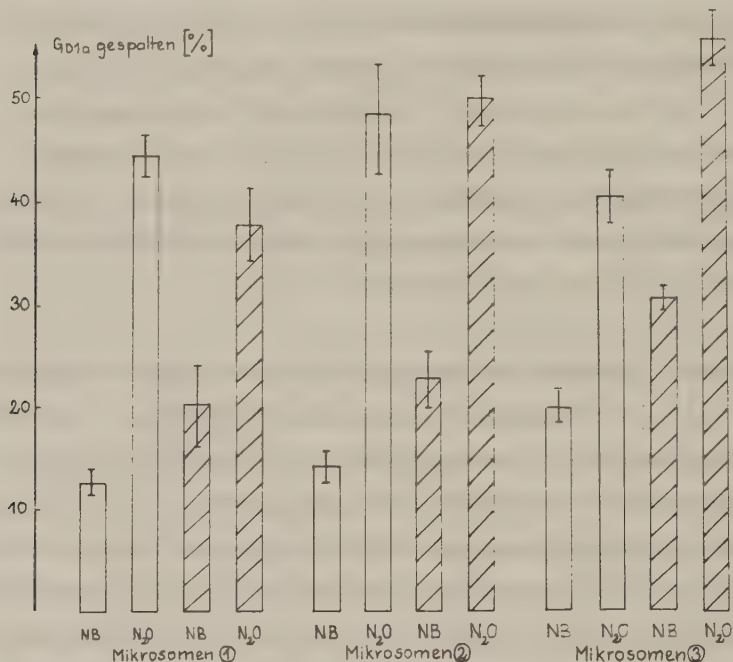


Abb. 17 Einfluß unterschiedlicher Waschpuffer auf die Aktivität der membrangebundenen Neuraminidase

Zur Entfernung der Saccharose wurden Mikrosomen bei pH=7.2 entweder mit Ringer-Lösung (Mikrosomen 1), physiol. Kochsalzlösung (Mikrosomen 2) oder 10 mM Tris/HCl-Puffer (Mikrosomen 3) je zweimal gewaschen.

Danach erfolgte direkt der Test auf die Neuraminidaseaktivität gegenüber G_{D1a} unter Normalbedingungen (NB) oder 30 atm Lachgas (N₂O).

Die Inkubationen enthielten 10 nmol [³H] G_{D1a}, 100 µg Mikrosomenprotein und folgende, unterschiedliche Inkubationspuffer (Acetatpuffer von pH=4.2):

- Ionenstärke 150 mM
- ▨ Ionenstärke 33 mM.

Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C. Zur Methodik vgl. Abschn. 5.

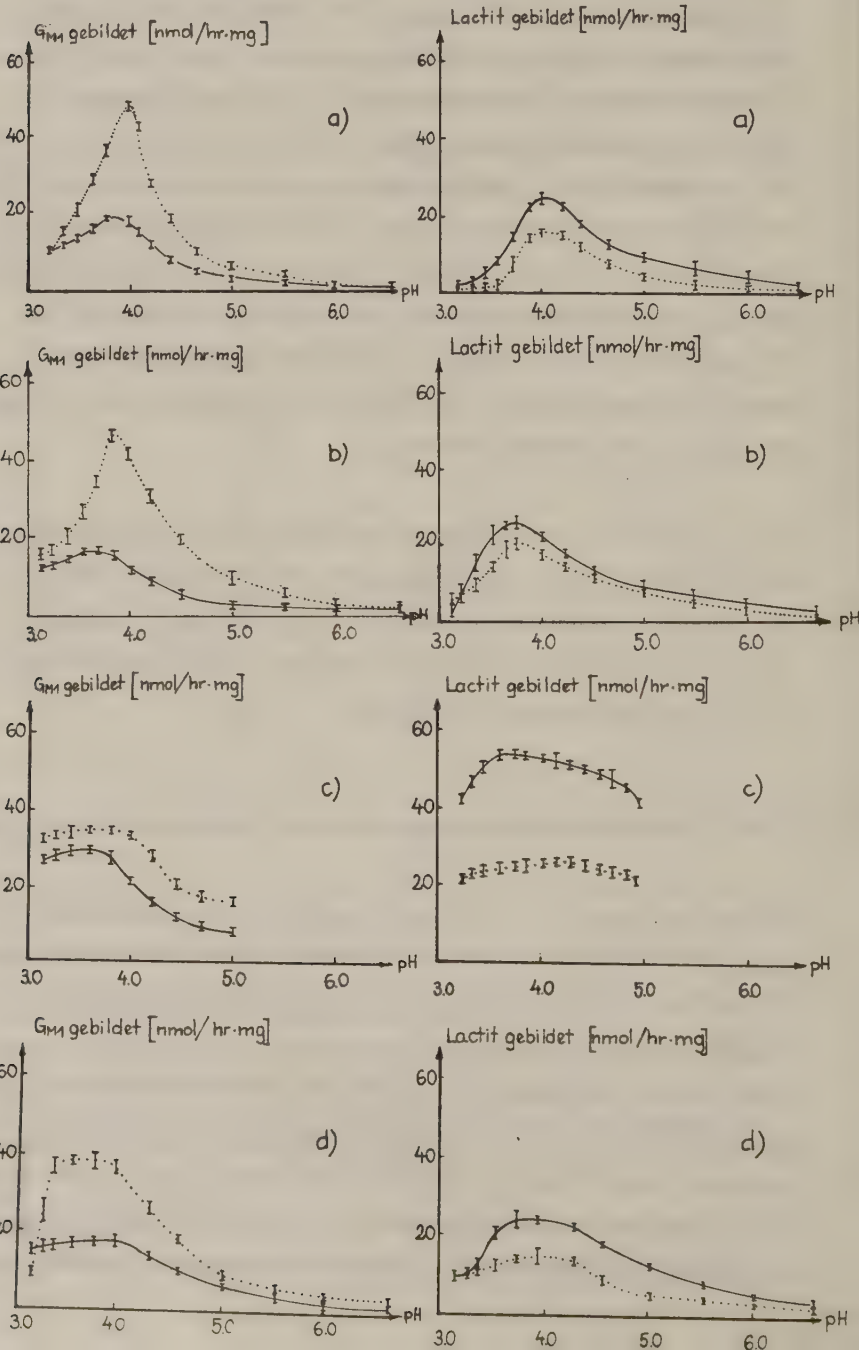
Wie in Abb. 17 gezeigt ist, sind sowohl die spezifische Grundaktivität der membrangebundenen Neuraminidase als auch die Stimulierungsrate unter 30 atm Lachgas gegenüber dem Substrat G_{D1a} von der jeweiligen Vorbehandlung der Enzympräparation abhängig. Es fällt auf, daß unter beiden Inkubationsbedingungen (NB und N_2O) die Enzymaktivität mit fallender Ionenstärke des Waschpuffers ansteigt. So werden einerseits durch die Erhöhung der Ionenstärke bei der Enzympräparation Membrankomponenten immobilisiert, andererseits jedoch die elektrostatisch-assoziativen Kräfte an der Membranoberfläche verstärkt. Dieser Einfluß auf die Enzymaktivität läßt sich auch im enzymatischen Test mit G_{D1a} als Substrat demonstrieren: mit fallender Ionenstärke des Inkubationspuffers (von 150 mM auf 33 mM Acetatpuffer, $pH=4.2$) ist eine Zunahme der enzymatischen Aktivität und eine Verminderung der Stimulierungsrate unter 30 atm Lachgas festzustellen.

Damit scheinen sich die Mikrosomen hinsichtlich ihrer Ionenstärkeabhängigkeit ähnlich wie andere Präparationen neuronaler Membranen zu verhalten. So ließ sich an Synaptosomen zeigen (125), daß niedrige Ionenstärken zu einer partiellen Desintegration, hohe Ionenstärken jedoch zu einer Stabilisierung der Membranpräparation beitragen.

2.2.6. pH-Wert- und Pufferabhängigkeit der Substratspaltung durch die Neuraminidase

Im folgenden Abschnitt wird über das pH-Profil der membrangebundenen Neuraminidase in Gegenwart verschiedener Pufferlösungen mit unterschiedlichen Ionenstärken berichtet. Als Enzymquelle dienten Mikrosomen, die mit 10 mM Tris/HCl-Puffer ($pH=7.2$) gewaschen worden waren. Nach Vorversuchen war sichergestellt worden, daß die verwendeten Mengen an Inkubationspuffer zur Kompensation des 10 mM Tris/HCl-Puffers ausreichen. Da eingestellte, konzentrierte Pufferlösungen beim Verdünnen ihren pH-Wert geringfügig verändern können, wurde zur genauen Registrierung des pH-Wertes im Inkubationsansatz von jedem Testgemisch ein Aliquot von 20 μl vor und nach der enzymatischen

Reaktion entnommen und mit einer pH-Mikroelektrode (vgl. Abschn. 5) getestet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 a - e zusammengefaßt:



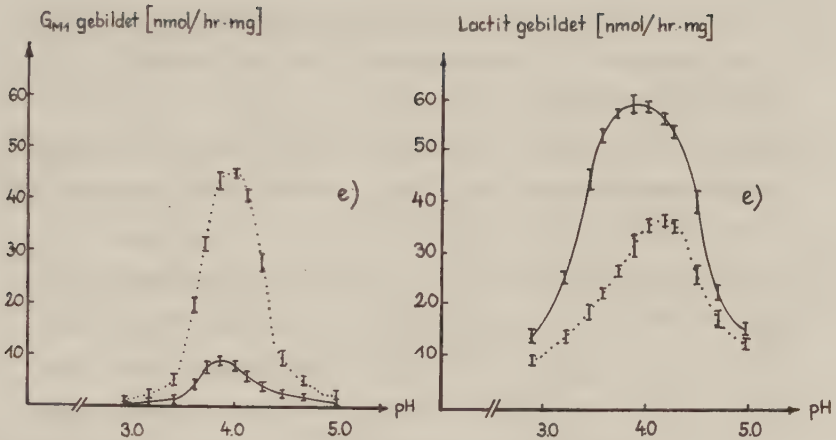


Abb. 18 pH-Profil der membrangebundenen Neuraminidase

Inkubationsansätze von 100 μ l enthielten 10 nmol [3 H] G_{D1a} bzw. 200 nmol [3 H]Sialyllactit, 100 bzw. 400 μ g Mikrosomenprotein und Inkubationspuffer mit folgenden Ionenstärken (I):

- a) Na-Acetatpuffer; I=150 mM, eingestellt mit NaCl
- b) Na-Acetatpuffer; I=100 mM, eingestellt mit NaCl
- c) Na-Acetatpuffer; I= 33 mM, eingestellt mit NaCl
- d) Na-Acetatpuffer; gesamter Acetatgehalt 100 mM; I deshalb variabel;
- e) Na-Glycolatpuffer (100 mM) mit 5 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ und 135 mM NaCl im Inkubationsansatz.

I—————I Normalbedingungen

I.....I unter 30 atm Lachgas

Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C, zur Methodik vgl. Abschn. 5.

Die Ergebnisse aus den Abbildungen 18 a - e lassen sich folgendermaßen interpretieren:

- 1) Das pH-Optimum der enzymatischen Katalyse durch die membrangebundene Neuraminidase ist von der Art des verwendeten Puffers abhängig.
- 2) Die beiden Substrate G_{D1a} und Sialyllactit werden je nach dem eingesetzten Inkubationspuffer im Bereich von pH = 3.7 bis pH = 4.2 optimal gespalten.
- 3) Mit zunehmender Ionenstärke I des Inkubationspuffers sinkt der Substratabbau unter Normalbedingungen, also die Basisaktivität des Enzyms. Die

Stimulierung der Gangliosidspaltung durch Lachgas (30 atm) erreicht mit etwa physiologischer Ionenstärke des Inkubationspuffers (Abb. 18 e) einen Maximalwert, der Sialyllactitabbau wird durch Lachgas bis zu 50 Prozent inhibiert.

- 4) Bei niedrigen Ionenstärken (33 mM; Abb. 18 c) ist das pH-Profil verwischt, ein Optimum der Enzymkatalyse gegenüber beiden Substraten kaum feststellbar.
- 5) Möglicherweise verschiebt sich das pH-Optimum der Substratspaltung unter 30 atm Lachgas um ca. 0,1 pH-Einheiten in den alkalischen Bereich (Abb. 18 a,b,d,e). Dies ließ sich jedoch trotz umfangreicher Meßserien nicht sicher beweisen. Neben einer Verunreinigung der Lachgaspräparation, Bildung von N_2O -Hydraten an Membranstrukturen, Kontamination der Inkubationsansätze mit N_2O -labilen alkalischen Weichmachern aus den Inkubationsgefäßen oder Veränderungen der Tertiärstruktur des Enzyms bei hohen Gasdrucken sind auch Änderungen in den Dissoziationskonstanten der Pufferlösungen in Gegenwart von Lachgas denkbar. Diese Möglichkeiten wurden nicht näher untersucht.
- 6) Das klarste pH-Profil wurde mit einem Glycolatpuffer in Anwesenheit von 5 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ und 155 mM NaCl erhalten. Die Ionenstärke dieses Puffers (Abb. 18 e) entspricht nach (126) der Ionenstärke der Cerebrospinalflüssigkeit. Mit dieser Pufferlösung wurde ein pH-Optimum für die Spaltung beider Substrate von $pH=5.85$ erhalten. Daher wurde im Folgenden die Ionenabhängigkeit der enzymatischen Reaktion vom Zusatz einzelner Ionen in einem 100 mM Glycolatpuffer, $pH=5.85$ untersucht (Abschn.2.2.7.).

2.2.7. Ionenabhängigkeit der membrangebundenen Neuraminidase

Bereits bei den Untersuchungen zur Pufferabhängigkeit des Enzyms waren Einflüsse der Ionenstärke auf die enzymatische Aktivität deutlich geworden (vgl. Abschn. 2.2.5 und 2.2.6.). Zur näheren Untersuchung dieser Ionenabhängigkeit wurden Kalbshirn ikrosomen dem enzymatischen Test mit G_{D1a} und Sialyllactit als Substrate bei einem pH-Wert von 3.85 in einem 100 mM Glycolatpuffer mit steigendem Anteil ein- und zweiwertiger Ionen inkubiert (Abb. 19).

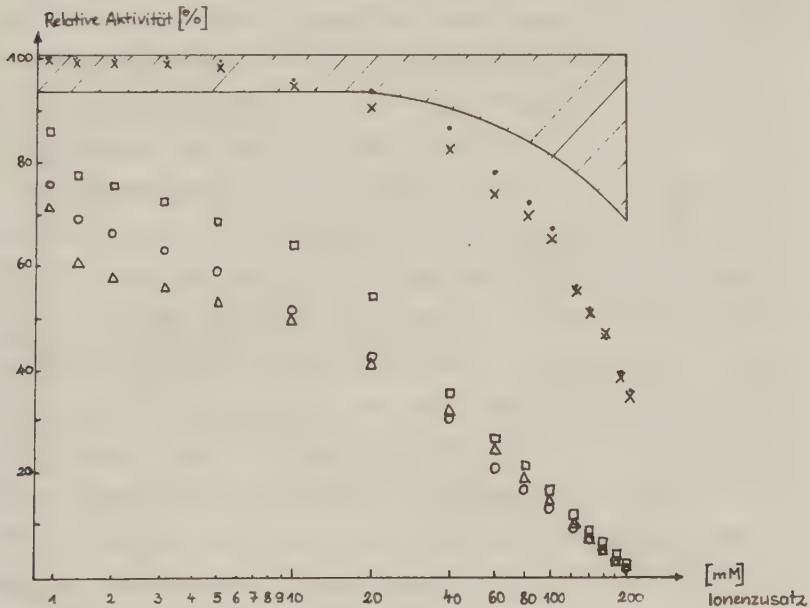


Abb. 19 Ionenabhängigkeit der membrangebundenen Neuraminidase

Inkubationsansätze von 100 μ l enthielten 10 nmol [3 H] G_{D1a} bzw. 200 nmol [3 H]Sialyllactit, 100 bzw. 400 μ g Mikrosomenprotein in einem Glycolatpuffer (pH=3.85),

▨ Einfluß von Ionen auf die Sialyllactitspaltung

Einfluß von Ionen auf die G_{D1a} - Spaltung

x x -NaCl, ... -KCl, □ □ -MgCl₂, ○ ○ -CaCl₂, △ △ -MnCl₂.

Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C. Zur Methodik vgl. Abschn. 5.

Die in Abb. 19 gezeigten Ergebnisse machen deutlich, daß mit steigendem Ionenzusatz die Abbauraten beider Substrate abnehmen. Das wasserlösliche Substrat Sialyllactit ist hiervon jedoch wesentlich stärker betroffen als das Gangliosidsubstrat G_{D1a} . Da die Ionenstärke I definiert ist (127) als

$$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i \cdot z_i^2,$$

wobei m die Anzahl der beteiligten Ionen und z ihre Ladung darstellen, scheint nach den in Abb. 19 nicht die Ionenart sondern die Gesamtionenstärke I den Substratumsatz zu bestimmen. Dennoch muß für zweiwertige Ionen, besonders für Ca^{2+} , ein spezifischer Membraneinfluß unterstellt werden. So kann z.B. Ca^{2+} die negativen Ladungen verschiedener Lipide an der Membranoberfläche komplexierend verknüpfen (119). Daß diese komplexierende Eigenschaft vor allem für die geladenen Neuraminsäurereste der Ganglioside von Bedeutung ist, wird in Abb. 19 angedeutet, da die Hemmung der enzymatischen Reaktion mit G_{D1a} als Substrat durch zweiwertige Ionen im Vergleich zu einwertigen Ionen überproportional ausgeprägt ist. Da, wie bereits erwähnt (Abschn. 2.2.4.), die Oberflächenladung von Membranen auf die Fluidität an der hydrophilen Membrangrenzfläche Einfluß nimmt, ist zu erwarten, daß sich mit geeigneten Methoden quantitative Zusammenhänge zwischen der Membranfluidität und der Oberflächenladung nachweisen lassen. Aus den im Abschnitt 2.2.4. genannten Gründen konnten derartige Zusammenhänge mit dem hydrophoben Membranmarker DPH nicht registriert werden. Allerdings lassen sich mit DPH Einflüsse auf die Mikroviskosität im hydrophoben Bereich der Mikrosomenmembran zeigen, wenn Lipide mit fluiditäts-senkenden oder -steigernden Eigenschaften der Enzympräparation zugesetzt werden. Der folgende Abschnitt (2.2.8.) wird über diese Untersuchungen berichten.

2.2.8. Lipidabhängigkeit der membrangebundenen Neuraminidase

Der Einbau lipophiler Substanzen in Membranstrukturen sollte je nach den strukturellen Eigenschaften der Lipide zu einer Membranverfestigung oder zu einer Membranfluidisierung führen. Bei einer Membranverfestigung erhöht sich nach (117) die Fluoreszenzpolarisation P des Membranmarkers DPH. Ähnlich wie bei den Fluidisierungsstudien mit dem Anästhetikum Halothan (vgl. Abschn. 2.2.3. und 5.) wurden zur Untersuchung der Lipidabhängigkeit der membrangebundenen Neuraminidase steigende Mengen der in Abb. 20 angegebenen Lipide mit Mikrosomenmembranen vorinkubiert, mit DPH markiert und im Mikroviskosimeter bei 37°C untersucht:

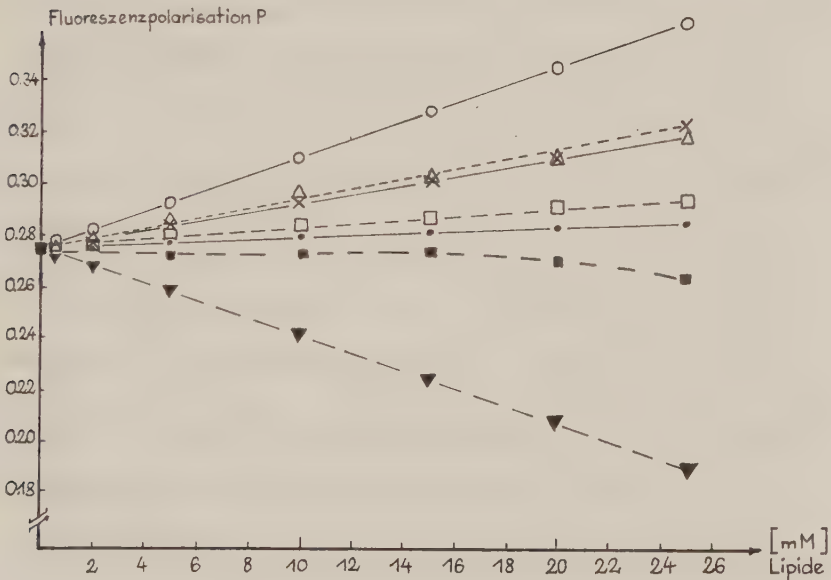


Abb. 20

Veränderungen der Fluoreszenzpolarisation P von DPH in mikrosomalen Membranen durch Lipidzusatz

○—○ Lecithin; ×—× Sphingomyelin; Δ—Δ Sulfatide; □—□ Kephaline;
•—• Cholesterin; ■—■ Dimiristoylphosphatidylcholin; ▼—▼ Lysolecithin;

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Die in Abb. 20 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß alle Lipide mit hohen

Phasenumwandlungstemperaturen : Dipalmitoylphosphatidylcholin = Lecithin

Sphingomyelin = Mischung aus C_{18} - C_{24} -Acyl-

Sphingophosphorylcholin

Sulfatide = natürliche Mischung aus den

Schwefelsäureestern der Galacto-
cerebroside

zu einer Steigerung der Fluoreszenzpolarisation P, also zu einer Absenkung der Fluidität führen. Nicht geklärt werden konnte, warum in Gegenwart von Cholesterin keine Veränderung von P zu beobachten war. Da alle eingesetzten Lipide vor der Inkubation zusammen mit den Mikrosomenmembranen ultrabeschallt wurden, konnte zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht unterstellt werden, daß sich Cholesterin prinzipiell in seinen Lösungseigenschaften in Lipidphasen von anderen Lipiden unterscheidet. Neuere Untersuchungen (128,129) hatten jedoch inzwischen zeigen können, daß Cholesterin in wässrigen Lösungsmitteln keine definierten Lipidaggregate ausbilden kann. Der Verschmelzungsmechanismus mit Membranstrukturen erfordert im Falle von Cholesterin höhere Aktivierungsenergien (längere Inkubationsdauer, höhere Temperatur oder höhere Energie beim Ultrabeschallen), so daß die Inkubationsbedingungen für dieses Lipid nicht optimal gewählt waren. Eigene Untersuchungen mit ^{14}C -markiertem Cholesterin konnten diese Vermutung insofern bestätigen, als unter den angegebenen Bedingungen über 90 Prozent des eingesetzten Cholesterin bei Konzentrationen bis zu 15 mM in aggregierter Form neben den Mikrosomenmembranen vorlag. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des bekannten Tyndalleffektes im 50,000 g-Überstand einer Cholesterin/Mikrosomen-Präparation.

Andererseits zeigten jedoch die Lipide Lysolecithin (diese Lysoverbindung läßt sich durch enzymatische Abspaltung einer Fettsäure an C_2 - des Glycerin durch das Enzym Phospholipase A_2 erhalten (9)), sowie Dimiristoyllecithin den erwarteten Fluidisierungseffekt, da die Phasenumwandlungstemperaturen dieser Verbindungen weit unterhalb der Inkubationstemperatur der Fluiditätsbestimmung lag (119).

An dieser Stelle sollen die in Abb. 20 gezeigten Ergebnisse einer kritischen Diskussion unterzogen werden, da neuere Arbeiten über die Methoden zur Verschmelzung von Lipiden mit Membranstrukturen (129,130,131) und in Abschnitt. 2.2.9. der vorliegenden Arbeit Zweifel an einem tatsächlichen Verschmelzen sämtlicher Lipide mit den Mikrosomenmembranen aufkommen lassen:

So wurde bisher angenommen (118, 132, 133, 134), durch Eindampfen von Lipidlösungen aus organischen Phasen, Wiederaufnahme in wässriger Pufferlösung und anschließendem Ultraschall in Gegenwart von Geweben wurden homogene Mischphasen aus Zellgewebe und zugesetzten Lipiden gebildet. Dies ist jedoch nur für bestimmte Konzentrationsbereiche von Lipid- und Membranphase und nur unter Berücksichtigung der struktur- sowie ladungsbedingten Lipidparameter zulässig, da offensichtlich unterschiedliche Lipidpopulationen auftreten können, die in vesikulärem Zustand an die Membran angelagert werden, ohne in einem endozytotischen Prozess von ihr aufgenommen zu werden. Da über die molekularen Mechanismen der Endocytose von Membranbruchstücken bisher keine exakten Daten in der Literatur bekannt sind, ist nur zu vermuten, daß die in Abb. 20 dargestellten Ergebnisse einen Durchschnitt der Fluoreszenzpolarisation von P unterschiedlicher Lipidpopulationen darstellen. Um diese Fragen eindeutig zu klären, hätten andere, zum Teil bisher noch auf Arbeiten mit künstlichen Lipidmembran beschränkte Methoden (z.B. ^{13}C -NMR, Elektronen-Spin-Resonanz, calorimetrische Methoden (119,135,136,137)), zur Überprüfung der Fluiditätsveränderungen in gemischten Lipidphasen als Vergleichssysteme herangezogen werden müssen. Zumindest für Ganglioside in mizellarem Zustand und ihrer Anlagerung an mikrosomale Membranen wird in einem späteren Abschnitt gezeigt werden, daß sich unterschiedliche Gangliosidpopulationen nachweisen lassen (Abschn. 2.2.9).

Für die hier vorliegenden Messungen ist unter Berücksichtigung der angeführten Einschränkungen festzustellen, daß "Mischphasen" aus Lysolecithin und Mikrosomenmembranen sowie Dimiristoyllecithin eine deutlich herabge-

setzte Fluoreszenzpolarisation P von DPH bereits ab Konzentrationen von 2 mM bewirken können. Wie inzwischen aus Untersuchungen mit primären Alkoholen bekannt ist (87), entspricht der in Gegenwart von Lysolecithin erhaltene Kurvenverlauf einer Fluidisierungsrate, wie man sie durch 10^{-3} bis 10^{-2} M Konzentrationen der Alkohole Heptanol und Oktanol erhält.

Parallel zu der Fluiditätsmessungen wurden ebenfalls die Substratumsätze für G_{D1a} und Sialyllactit in Anwesenheit der gleichen Lipide untersucht.

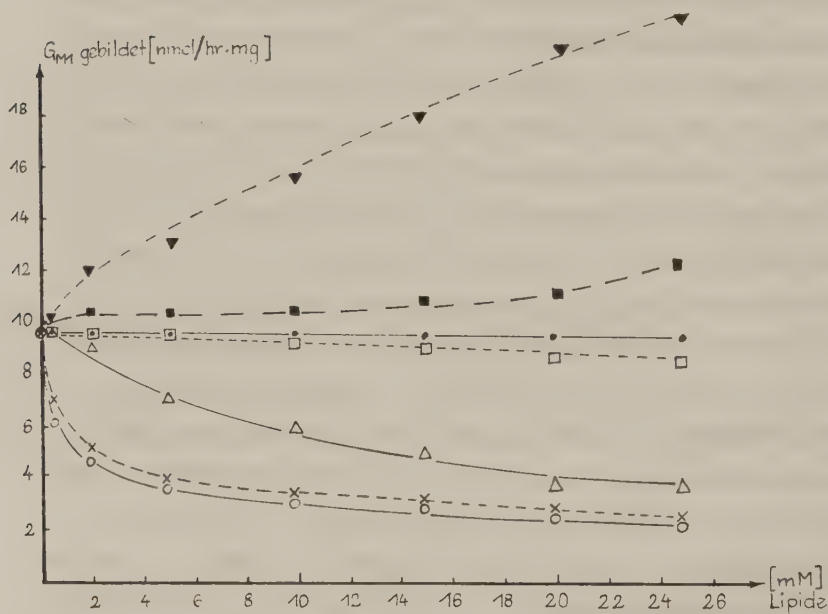


Abb. 21

Lipidabhängigkeit der G_{D1a} -Spaltung durch die membrangebundene Neuraminidase
 Inkubationsansätze von $100 \mu\text{l}$ mit $10 \text{ nmol } [^3\text{H}]G_{D1a}$, $100 \mu\text{g}$ Mikrosomenprotein und 100 mM Glycolatpuffer mit 5 mM CaCl_2 und 135 mM NaCl $\text{pH} = 3.25$ wurden mit steigenden Mengen an Lipid versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C .

o—o Lecithin; x—x Sphingomyelin; □—□ Kephalline; •—• Cholesterin;
 ■—■ Dimiristoylphosphatidylecholin; ▼—▼ Lysolecithin; Δ—Δ Sulfatide;

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Die auf der vorhergehenden Seite in Abb. 21 zusammengefaßten Ergebnisse machen deutlich, daß mit G_{D1a} als Substrat alle fluiditätssenkenden Lipide eine Hemmung der Substratspaltung hervorrufen (Lecithin $\rightarrow$ Sphingomyelin $\rightarrow$ Sulfatide $\rightarrow$ Kephalin $\rightarrow$ Cholesterin).

Mit Sialyllactit als Substrat (Abb. 22) war eine deutliche Hemmung der Substratspaltung jedoch nur mit den Lipiden Lecithin und Sulfatiden fest-Lactit gebildet [nmol/hr.mg]

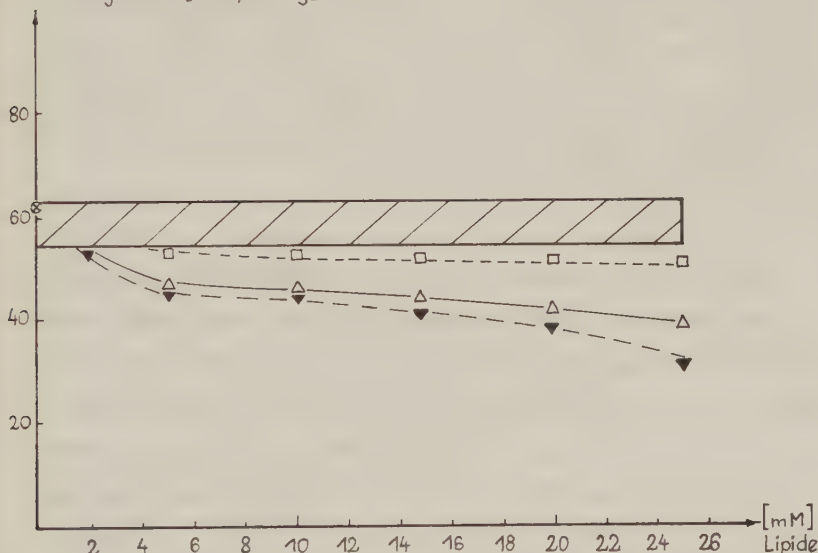


Abb. 22

Lipidabhängigkeit der Sialyllactit-Spaltung durch die membrangebundene Neuraminidase

Inkubationsansätze von 100 μ l mit 200 nmol [3 H]Sialyllactit, 400 μ g Mikrosomenprotein und 100 mM Glycolatpuffer mit 5 mM $CaCl_2$ und 135 mM NaCl pH = 3.85 wurden mit steigenden Mengen an Lipid versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C.

▼—▼ L-solecithin; ▲—▲ Sulfatide; □—□ Kephalin;

▨ übrige Lipide (vgl. Abb. 21)

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

stellbar. So hatte z.B. Sphingomyelin, das den Abbau des Gangliosidsubstrates G_{D1a} ähnlich stark wie Lecithin verlangsamt (vgl. Abb. 21), gegenüber dem wasserlöslichen Substrat keinen Einfluß. Möglicherweise ist dieser Unterschied auf die Bildung besonders stabiler Mischphasen zwischen dem Gangliosid G_{D1a} und Sphingomyelin zurückzuführen, die einer Diffusion monomerer Substratmoleküle innerhalb der Lipidmembran zum Ort der enzymatischen Katalyse entgegenwirken. Hierfür hatten auch andere, spektroskopische Untersuchungen (138) Hinweise erbracht, die eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe des Sphingosin und der Carboxylgruppe der Fettsäure eines benachbarten Glycolipids in künstlich hergestellten Lipidphasen postuliert hatten.

Mit Ausnahme von Cholesterin ließ sich im vergangenen Abschnitt also zeigen, daß Lipide mit fluiditätssenkenden Eigenschaften den Gangliosidabbau stark, den Sialyllactitabbau jedoch schwächer hemmen. Membranfluidisierende Lipide wie Lysolecithin oder Dimiristoyllecithin steigerten dagegen bereits in einer Konzentration von ~ 2 mM den Gangliosidabbau deutlich. Damit verstärkt sich also die Vermutung, daß die Enzymaktivität der membrangebundenen Neuraminidase vor allem durch die Zusammensetzung der umgebenden Lipidphase reguliert wird und membrangebundene Substrate von dieser Eigenschaft des Enzyms stärker beeinflußt werden als wasserlösliche Substrate.

Es blieb allerdings offen, ob bei der registrierten Veränderung der Fluoreszenzpolarisation P homogene Membranphasen oder Mischpopulationen von Lipiden gemessen wurden. Die Frage nach dem Auftreten unterschiedlicher Lipidphasen beim Einbau exogener Lipide in Mikrosomen ist jedoch für die korrekte Interpretation von enzyrkinetischen Daten vor allem dann von Bedeutung, wenn die angebotenen Lipide selbst Substrate membrangebundener Enzyme sind. über die Bindung exogen zugesetzter Ganglioside an Mikrosomen wird im Folgenden berichtet.

2.2.9. Einbau mizellarer Ganglioside in mikrosomale Membranen

Die bisher unter reinen in vitro-Verhältnissen erhaltenen Ergebnisse lassen sich nur dann in einem Konzept für intakte biologische Membransysteme zusammenfassen, wenn der Kontakt von Enzym und Substrat im Inkubationsansatz auch tatsächlich in vivo-Bedingungen simulieren kann. Eine wesentliche Bedeutung hat dabei die Art der Bindung von Gangliosiden an die Membranen. Nach bisherigen Vorstellungen (139) über die Biosynthese von Glycolipiden und ihrem Einbau in Lipidphasen sollen Ganglioside in einem noch weitgehend ungeklärten Mechanismus in Form von Mizellen an Membranen angelagert und mit diesen verschmolzen werden. Zwangsläufig sollten also nicht-membrangebundene Gangliosidaggregate im Cytosol intakter Zellen nachzuweisen sein. Erste Untersuchungen hierüber wurden vor kurzem bekannt (79), die zeigten, daß etwa 5 Prozent des gesamten Gangliosidgehaltes als Gangliosid/Protein-Komplexe im Cytosol neuronaler Zellen auftreten, da diese Komplexe im Gegensatz zu reinen Gangliosidmizellen durch Fraktionieren mit Ammoniumsulfatlösungen fällbar waren.

Da über die nähere Charakterisierung dieser Lipoproteinkomplexe bisher keine genaueren Angaben gemacht wurden, erscheint es sinnvoll, auch die Bindung proteinfreier Gangliosidmizellen an mikrosomale Membranen zu untersuchen. Dabei stellen sich zunächst folgende Fragen:

- 1) In welchen Konzentrationsbereichen läßt sich ein bestimmtes Gangliosid an eine vorgegebene Menge an Mikrosomenmembran anlagern?
- 2) Wird dieses Gangliosid quantitativ in die Membranen integriert oder sind verschiedene Populationen durch Erhöhung der Ionenstärke oder Verdauen der Membranen mit Trypsin wieder ablösbar?

Um diese Fragen näher zu untersuchen, wurden Einbaustudien mit dem radioaktiv-markiertem Gangliosid [^3H]G_{M2}, einem Inhibitor der membrangebundenen Neuraminidase, durchgeführt. Hierfür wurden steigende Mengen [^3H]G_{M2} kurz (10 Sekunden bei 0°C in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2) ultrabeschallt und nach weiterer Ultrabeschallung mit einer konstanten Membranmenge (100 µg

Mikrosomenprotein in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2; Ultraschall: 10 Sekunden bei 0°C) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Inkubationsmischung auf 0°C abgekühlt, mit kaltem Inkubationspuffer resuspendiert und anschließend 30 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert. Das in der Abb. 23 nach der Zen-

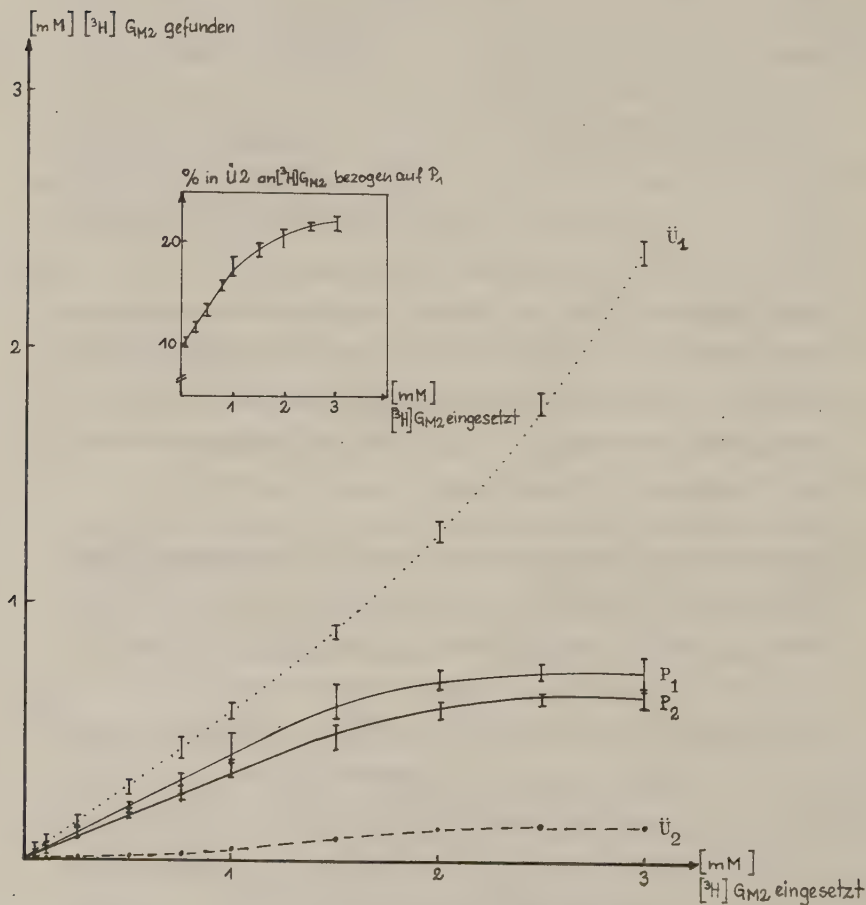


Abb. 23 Einbau von Gangliosid $[^3\text{H}] \text{GM}_2$ in Mikrosomenmembranen

Inkubationsansätze von 100 μl (in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH = 7.2) mit 100 μg Mikrosomenprotein wurden mit steigenden Mengen $[^3\text{H}] \text{GM}_2$ (in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH = 7.2) versetzt, ultrabeschallt, inkubiert und zentrifugiert. Die Radioaktivität in den Überständen Ü_1 und Pellets P_2 wurde bestimmt. Die Pellets P_1 wurden in 140 mM NaCl/10 mM Tris/HCl-Puffer, pH = 7.2 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Man erhielt die Überstände Ü_2 und P_2 . Zur Methodik vgl. Text und Abschn. 5.

trifugation erhaltene Pellet P_1 wurde erneut mit frischem Puffer resuspendiert, der 140 mM NaCl enthielt, gut durchmischt und ohne weitere Vorbehandlung erneut bei 100.000 g zentrifugiert. Die Überstände nach der 1. sowie der 2. Zentrifugation und die resultierenden Pellets ($\bar{U}_1$, $\bar{U}_2$ und P_1, P_2) wurden auf ihre Radioaktivität getestet (vgl. Abschn. 5).

Aus der Abb. 23 ist zu sehen, daß ab einer Konzentration von etwa 1,5 mM $[^3H]G_{M2}$ (dies entspricht einer Konzentration von 150 nmol/100 μ l Inkubationsvolumen) die Mikrosomenmembranen mit dem Gangliosid G_{M2} "gesättigt" sind, da der Anteil an nicht im Pellet P_1 gebundenem Gangliosid im Überstand $\bar{U}_1$ überproportional ansteigt. Separiert man nun das Pellet P_1 und versetzt es mit einer 140 mM NaCl/10 mM Tris/HCl-Pufferlösung (pH=7.2), so verliert das Pellet P_1 nach erneuter Zentrifugation nochmals zwischen 10 und 20 Prozent an $[^3H]G_{M2}$. Dieser Anteil $[^3H]G_{M2}$ im Überstand $\bar{U}_2$ ist in der kleinen Abb. von Abb. 23 wiedergegeben. Da die ursprünglich eingesetzte Menge an $[^3H]G_{M2}$ bekannt war, läßt sich der im Pellet P_2 verbliebene Anteil des Gangliosids $[^3H]G_{M2}$ bestimmen. Die Zentrifugation hat gezeigt, daß offensichtlich verschiedene Gangliosidaggregationen an Mikrosomenmembranen nachzuweisen sind:

- a) adsorbierte Gangliosidmizellen von $[^3H]G_{M2}$
- b) fest an oder in die Mikrosomen gebundenes $[^3H]G_{M2}$.

Dieses fest gebundene $[^3H]G_{M2}$ hemmt im enzymatischen Test der Neuraminidaseaktivität den Gangliosidabbau von G_{D1a} nach den in Abb. 24 gezeigten Daten bereits bei einer Konzentration von 0,2 mM an $[^3H]G_{M2}$ halbmaximal. Frühere Experimente (84) mit mizellarem Gangliosid G_{M2} hatten dagegen wesentlich höhere Konzentrationen dieses Gangliosids für eine halbmaximale Hemmung der G_{D1a} -Spaltung benötigt (vgl. hierzu auch Tab. 6 Abschn. 2.2.4.).

Eine grobe Kalkulation soll zeigen, in welchem Verhältnis endogene Ganglioside und das exogen zugesetzte Gangliosid G_{M2} nach den in Abb. 23 und 24 gezeigten Daten im Inkubationsansatz vorliegen:

Im Inkubationsansatz mit $[^3H]G_{D1a}$ als Substrat befinden sich 100 μ g Mikroso-

menprotein in 100 μ l Gesamtlösung. In Gegenwart von 1 mM exogen zugesetztem Gangliosid G_{M2} befinden sich also 100 nmol G_{M2} im Inkubationsansatz.

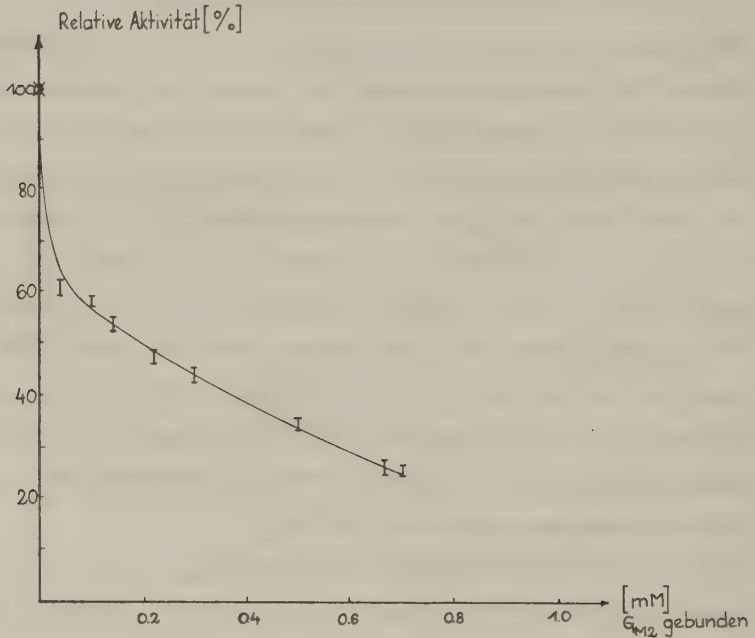


Abb. 24 Hemmung der Neuraminidaseaktivität in P_2 -Pellets (vgl. Abb. 23),

die steigende Mengen eingelagertes Gangliosid $[^3H]G_{M2}$ enthielten. Inkubationsansätze von 100 μ l, die 10 nmol $[^3H]G_{D1a}$, 100 μ g Mikrosomenprotein mit steigenden Mengen an eingelagertem $[^3H]G_{M2}$ enthielten, wurden in 100 mM Glycolatpuffer (mit 5 mM $CaCl_2$ und 135 mM NaCl, pH=3.85) 1 hr bei 37°C inkubiert.

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

In grober Näherungen bestehen Mikrosomen aus gleichen Teilen an Lipid und Protein, d.h. unter Berücksichtigung eines durchschnittlichen Lipidmolekulargewichtes von $M = 1000$ sind etwa 50 nmol Gesamtlipid im Inkubationsansatz. Von diesem Gesamtlipidgehalt beträgt der endogene Gangliosidanteil etwa 4 Prozent, also 2 nmol(35). Unter den in Abb. 23 geschilderten Bedingungen wird eine Membransättigung mit exogen zugesetztem Gangliosid G_{M2} also bei einer

etwa doppelten Menge exogenem G_{M2} bezogen auf den Gesamtlipidgehalt der Mikrosomenmembran erreicht. Daneben zeigen die in der Abb. 24 wiedergegebenen Daten, daß im Pellet P_2 die für eine halbmaximale Hemmung der Gangliosidspaltung notwendige G_{M2} -Menge im Inkubationsansatz etwa 2 nmol beträgt. Im P_2 -Pellet sind also nur noch 0.6 nmol der ursprünglich eingesetzten 3 nmol an $[^3H]G_{M2}$ zu finden. Dies läßt darauf schließen, daß unter den geschilderten Bedingungen nur maximal 20 - 30 Prozent des angebotenen Gangliosids in die Membran der Mikrosomen eingelagert wurden. Es stellt sich die Frage, ob das Auftreten von Gangliosidmischphasen bei in vitro Bedingungen ein allgemeines Kennzeichen der Ganglioside darstellt oder, wie im vorliegenden Fall, auf das Gangliosid G_{M2} beschränkt ist.

Um dies näher zu untersuchen, wurden Mikrosomen nach beschriebenen Verfahren mit Chloroform/Methanol-Lösungen extrahiert (11) die erhaltene und separierte Gangliosidmischung wurde nach (140) radioaktiv markiert und nach Auflösen (Ultraschall: 10 Sekunden) in 10 mM Tris/HCl-Pufferlösung pH=7.2 in steigenden Mengen einer normalen Mikrosomenpräparation zugesetzt. Diese radioaktiv markierte Gangliosidmischung enthielt nach radio-metrischer und dünn-schicht-chromatographischer Untersuchung (84,140) die Einzelganglioside in folgender Zusammensetzung:

G_{M1} : 27 %, G_{D1a} : 40 %, G_{D1b} : 16 %, G_{T1b} : 17 % (Standardabweichung 7 %) und etwa 2 % an nicht näher charakterisierten, unpolareren Lipiden. Diese radioaktiv markierte Gangliosidmischung entsprach in ihrer Zusammensetzung im wesentlichen dem endogenen Gangliosidmuster der Mikrosomen (84). 100 μ g Mikrosomenprotein wurden nun mit 10 nmol dieser radioaktiven Gangliosidmischung wie vorher bereits beschrieben (siehe Abb. 23 und Text) vorbehandelt, nach der 2. Zentrifugation jedoch nochmals mit 0.25 % Trypsin verdaut, um möglicherweise weitere Gangliosidpopulationen neben den NaCl-labilen Mizellen nachzuweisen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 25 zusammengefaßt.

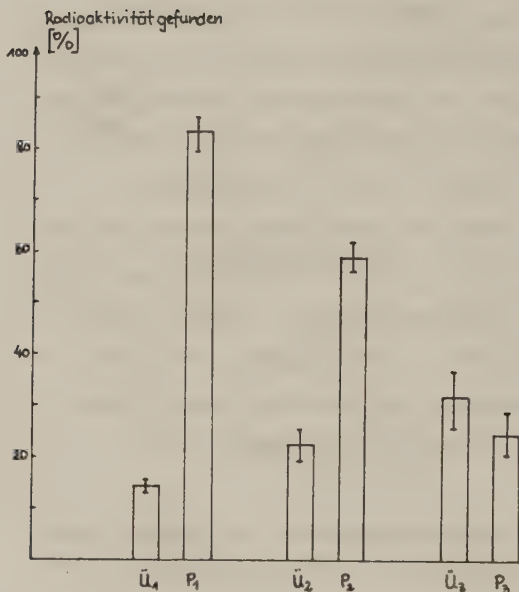


Abb. 25 Einbau einer radioaktiv markierten Gangliosidmischung in mikrosomale Membranen

Inkubationsansätze von 100 μ l, die 100 μ g Mikrosomenprotein und 10 nmol (0,1 mM) [3 H]markierte Gangliosidmischung enthielten (in 10 mM Tris/HCl-Pufferlösung), wurden 10 Sekunden ultraschallt, vorinkubiert (50 Minuten, 37°C) und zentrifugiert (30 Minuten, 100.000 g).

Das nach der 1. Zentrifugation erhaltene Pellet P₁ wurde in 10 mM Tris/HCl-Pufferlösung, die 140 mM NaCl enthielt (pH=7,2), bei 0°C resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Das nach der 2. Zentrifugation erhaltene Pellet P₂ wurde in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH=7,2) erneut resuspendiert und in Gegenwart von 0,25 % Trypsin 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

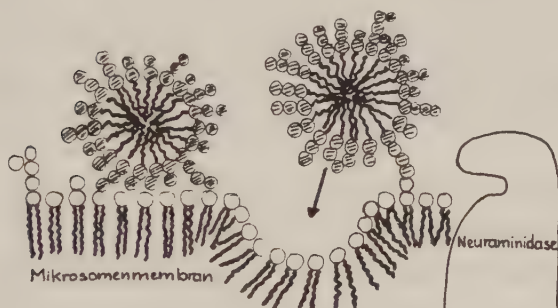
Nach einer weiteren Zentrifugation wurden der Überstand Ü₃ und das Pellet P₃ erhalten.

Alle Überstände und Pellets wurden auf ihre Radioaktivität überprüft, wobei die Radioaktivität im Pellet P₁ gleich 100 Prozent für die Fraktionen Ü₂ und P₂, die Radioaktivität im Pellet P₂ gleich 100 Prozent für die Fraktionen Ü₃ und P₃ gesetzt wurde.

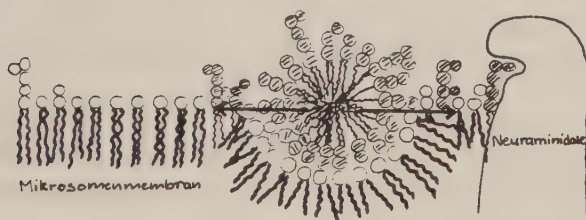
(zur Methodik vgl. Text und Abschn. 5)

Die in der Abbildung 25 aufgeführten Ergebnisse der Einbaustudien radioaktiv markierter Gangliosidmizellen in Mikrosomenmembranen lassen sich folgendermaßen interpretieren:

- 1) Gangliosidmizellen, die durch Ultraschall des proteinfreien Inkubationsansatzes hergestellt wurden, lagern sich nach Zugabe von Mikrosomen an diese an. Zwischen 10 und 20 Prozent der Mizellen sind im Überstand $\bar{U}_1$ nachweisbar, also nicht an die Membranen assoziiert.



- 2) Ein Teil dieser angelagerten Gangliosidmizellen läßt sich durch Erhöhung der Ionenstärke von den Mikrosomen ablösen (Überstand $\bar{U}_2$), es sind offenbar NaCl-labile Mizellen. Ein weiterer Anteil wird an Trypsin-labile Strukturen gebunden (Überstand $\bar{U}_3$).



- 3) Es ist zu vermuten, daß nur die im Pellet P_3 gebundenen Ganglioside tatsächlich in die Membran eingebaut worden sind. Ihre Zusammensetzung dürfte nach ersten radiometrischen Untersuchungen dem ursprünglich eingesetzten Gangliosidmuster weitgehend entsprechen.

Nach den in Abb. 25 gezeigten Daten existieren also mehrere, unterschiedlich an Mikrosomen gebundene Gangliosidpopulationen, die durch unbekannte An- und Einlagerungsmechanismen mit den Membranen in Kontakt treten. Energetisch bevorzugte Positionen für die Anlagerung und Verschmelzung von Gangliosidmizellen mit den Membranstrukturen könnten z.B. "Unstetigkeiten" der Lipidphase in der Nähe von Proteinen oder erst kürzlich entdeckte Grenzbereiche von sog. "Lipidplaques" darstellen. Allerdings gibt es hierfür noch zu wenige experimentelle Befunde. Immerhin wurden jedoch inzwischen ähnliche Gangliosidpopulationen wie die hier beschriebenen an speziellen Erythrozyten (Erythrozytenghosts) und an Fibroblastenkulturen nachgewiesen (141).

Da nach den vorangegangenen Messungen mehr als 70 Prozent der angebotenen Ganglioside wieder von den Mikrosomenmembranen abgelöst werden konnten, stellt sich die Frage nach der Tragfähigkeit des vorgestellten membranenzymologischen Konzeptes. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Verhältnisse im Inkubationsansatz von Membranphasen und Lipidsubstraten komplexer Natur sind. Nur für einen Teil des exogen zugesetzten Substrates scheint die "Nicht-Unterscheidbarkeit" zu endogenen Substraten zuzutreffen. Die Klärung der aufgetretenen Fragen muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, da über die auf molekularer Ebene ablaufenden Einlagerungsmechanismen von Glycolipiden, sei es an Zellkulturen oder an subzellulären Membranpräparationen, keine Erkenntnisse vorliegen (vgl. hierzu Abschn. 3.2.5., Seite 81).

Gerade deshalb dürfen parallel zu den Studien an rohen Enzympräparaten wie z.B. den hier verwendeten Mikrosomen die Bemühungen zur Reinigung der membran- gebundenen Neuraminidase nicht vernachlässigt werden. Eine diesen Versuchen entgegenwirkende Eigenschaft des Enzyms - seine Instabilität in Detergenzlösungen - ist möglicherweise durch Verwendung erst kürzlich bekannter Detergenzien (142) aus der Reihe zuckerhaltiger Alkanole zu umgehen.

Der letzte Abschnitt des vorgelegten Ergebnisteils dieser Arbeit wird diese Möglichkeit prüfen.

10. Extraktionsstudien zur Reinigung der membrangebundenen Neuraminidase

Die bisherigen Reinigungsversuche zur näheren Charakterisierung der membrangebundenen Neuraminidase (13,14,15,17,84) waren an der Labilität des Enzyms in Detergenslösungen gescheitert. Die Untersuchungen über das Verhalten des Enzyms in einer Rohpräparation wie den Mikrosomen hatten jedoch bei den Studien zur Lipidabhängigkeit der membrangebundenen Neuraminidase (Abschn. 2.2.8.) ergeben, daß Lysolecithin nur eine geringe Inaktivierung der enzymatischen Aktivität hervorruft. Die Anforderungen an ein ähnliches, jedoch synthetisches Detergens sollten also die Eigenschaften

- a) gute Extraktionskapazität
 - b) geringe Enzymschädigung
 - c) bekannte und rasche Verfahren zur Aufarbeitung der Enzymextrakte
- beinhalten. Bei der Suche nach derartigen Chemikalien war aufgefallen, daß Zuckerderivate langkettiger Alkanole den oben erwähnten Anforderungen bei anderen, labilen Enzymsystemen (143) entsprochen hatten.

So bestand die begründete Hoffnung, bei Einsatz eines amphiphilen Detergens mit hoher kritischer Mizellkonzentration (CMC) die solubilisierter Enzympräparation säulenchromatographisch vorzureinigen und anschließend aus enzymatisch aktiven Fraktionen das Detergens heraussudialysieren. Die Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität mit den beiden Substraten G_{D1a} und Sialyllactit gestatteten darüberhinaus weitere Hinweise auf das Vorhandensein möglicher membrangebundener Isoenzyme der Neuraminidase zu erhalten. Das Detergens Octyl- β -D-Glucopyranosid besitzt eine kritische Mizellkonzentration (CMC) von 25 mM (144) und wurde zunächst bezüglich seiner Extraktionskapazität gegenüber den Mikrosomenmembranen untersucht. In Abb. 26 ist das Extraktionsprofil des Mikrosomenprotein mit Octyl- β -D-Glucopyranosid dargestellt (siehe S. 66). Aus zwei separat aufgearbeiteten Kalbshirnmikrosomen wurde, wie in der Abb. 26 gezeigt ist, ein nahezu identisches Extraktionsprofil mit diesem Detergens erhalten:

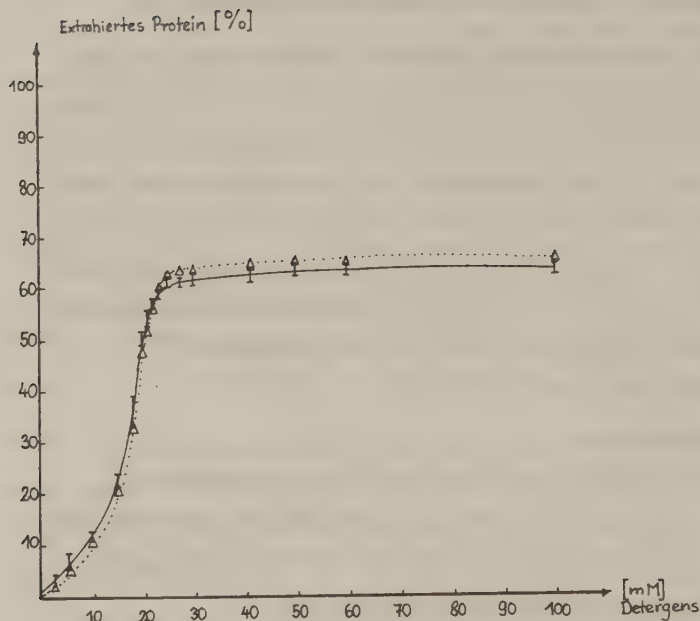


Abb. 26

Extraktion von Kalbshirnmikrosomen mit Octyl- β -D-Glucopyranosid

Bei 4°C wurden Kalbshirnmikrosomen (1 mg Protein/ml) mit steigenden Mengen an Detergens (in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH = 7.2) versetzt, gemischt, homogenisiert und 10 sec. ultrabeschallt. Nach der Zentrifugation (100.000 g, 1 hr, 4°C) wurde der Anteil an extrahierem Protein im Überstand bestimmt. (Die Kurve zeigt zwei zu verschiedenen Zeitpunkten mit verschiedenen Mikrosomen durchgeführte Extraktionen)

Der Gehalt an Neuraminidaseaktivität im Mikrosomen-Gesamthomogenat, dem 100.000 g Überstand und den entsprechenden Pellets wurde wieder mit den beiden Substraten G_{D1a} und Sialyllactit bestimmt. In den Abbildungen 27 a,b sind die Ergebnisse zusammengefaßt (siehe S. 67):

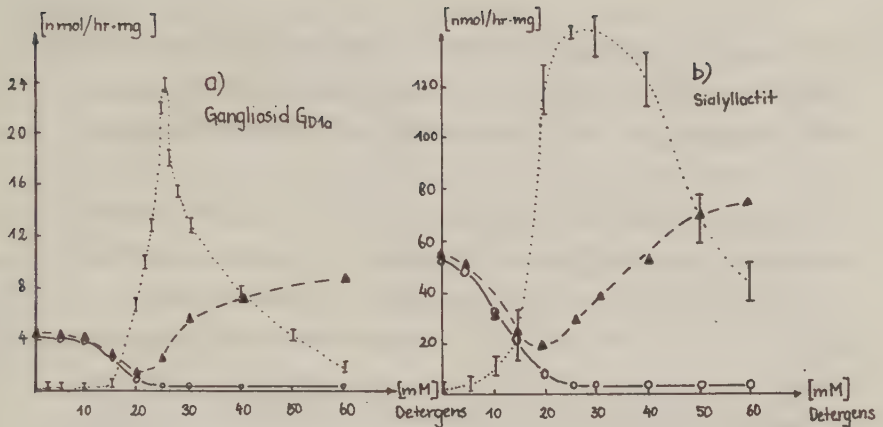


Abb. 27 a,b

Extraktionsprofil der membrangebundenen Neuraminidase in Gegenwart von Octyl-β-D-Glucopyranosid

Homogenate $\Delta - - \Delta$, Überstände $\cdots \cdots$, Pellets $\circ - - \circ$ wurden in Inkubationsansätzen von je 100 μ l mit 10 nmol [3 H]G_{D1a} bzw. 200 nmol [3 H]Sialyllactit, 100 μ g Protein und 100 mM Glycolatpuffer mit 5 mM CaCl₂ und 135 mM NaCl pH = 3,85 mit steigenden Mengen an Detergens versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1 hr bei 37°C.

(zur Methodik vgl. Abschn. 5)

Aus der Abb. 26 ist zu erkennen, daß sich mit Detergenskonzentrationen von 30 mM Octyl-β-D-Glucopyranosid etwa 60 Prozent des Gesamtproteins der Mikrosomen solubilisieren lassen. Die Enzymaktivität (Abb. 27) wird jedoch bereits ab Detergenskonzentrationen von ~20 mM in den 100.000 g Überstand extrahiert, im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 30 mM scheint das Optimum der Extrahierbarkeit von Neuraminidaseaktivität zu liegen, während höhere Detergenskonzentrationen vermutlich zu einer Schädigung des Enzymproteins in Lösung führen. Der nahezu identische Verlauf des Extraktionsprofils mit beiden Substraten (G_{D1a}: Abb. 27 a; Sialyllactit: Abb. 27 b) im Gesamthomogenat und Pellet in Gegenwart steigender Detergensenmengen läßt

vermuten, daß nur 1 Enzymprotein die Hydrolyse der unterschiedlichen Substrate katalysiert. Dennoch unterscheidet sich das Extraktionsprofil gegenüber beiden Substraten in den 100.000 g Überständen (Abb. 27). Hierfür könnten folgende Gründe verantwortlich sein:

- 1) Das Detergens Octyl- β -D-Glucopyranosid bildet mit dem Gangliosidsubstrat Mischmizellen, deren Zusammensetzung bei einem bestimmten Gangliosid/Detergens-Verhältnis eine optimale Enzymkatalyse für die Substratspaltung ermöglicht. Wird dieses Verhältnis durch den Einbau weiterer Detergensmoleküle verändert, so wird das Substrat durch Detergensmoleküle maskiert und nicht mehr vom Enzym erkannt.
- 2) Auch zwischen dem wasserlöslichen Substrat kann eine -allerdings wesentlich schwächere- Wechselwirkung mit Detergensmolekülen stattfinden, sie ist jedoch wegen der unterschiedlichen Lösungseigenschaften von Sialyllactit und Octyl- β -D-Glucopyranosid in einem weiteren Konzentrationsbereich variabel, als dies mit dem amphiphilen Gangliosidsubstrat der Fall ist, und deshalb mit einem breiten Optimum ausgestattet.
- 3) Die enzymatische Aktivität des Enzymprotein selbst wird bei höheren Detergensenkonzentrationen herabgesetzt. Unterstellt man eine hydrophobe Bindungsstelle am Enzymprotein für Gangliosidsubstrate (vgl. Abschn. 2.2.4), so müssen sich die unterschiedlichen Substrate auch bezüglich ihrer Affinität zu teilweise inaktivierten Enzympräparationen unterscheiden. Dies sollte sich, wie in Abb. 27 gezeigt, in einem unterschiedlichen Gang des Aktivitätsprofils bei höheren Detergensenkonzentrationen äußern.

Überraschend war, daß sich die Homogenate bezüglich der enzymatischen Neuraminidaseaktivität gegenüber beiden Substraten bis zu etwa 20 mM Detergensenkonzentrationen verringerten, bei höheren Konzentrationen jedoch über den Werten ohne Detergensenzusatz lagen. Da bis Detergensenkonzentrationen von 25 mM noch keine Mizellbildung zu erwarten war (144), könnte diese Beobachtung auf die Ausbildung von Mischmizellen oder eine partielle Belegung der Membranoberfläche mit Detergensmolekülen zurückzuführen sein, die den Zugang beider Substrate zum Enzym behindert. Bei höheren Detergensenkonzentrationen werden die

endogenen Membranlipide in zunehmendem Maße labilisiert. So könnten auch endogene Substrate der Neuraminidase und Inhibitoren des Enzyms (z.B. Ganglioside ohne Substrateigenschaften) extrahiert werden und einen vermehrten Substratzugang von exogenem Sialyllactit und G_{D1a} ermöglichen. Diese Behauptung ließ sich sehr einfach überprüfen, da bei höheren Detergengkonzentrationen ein zunehmender Anteil von Lipiden in den verschiedenen 100.000 g Überständen nachzuweisen sein sollte. Es wurden deshalb die entsprechenden Überstände gefriergetrocknet, mit lipidlösenden Agenzien extrahiert und einer dünnsschichtchromatographischen Analyse unterzogen (Abb. 28).

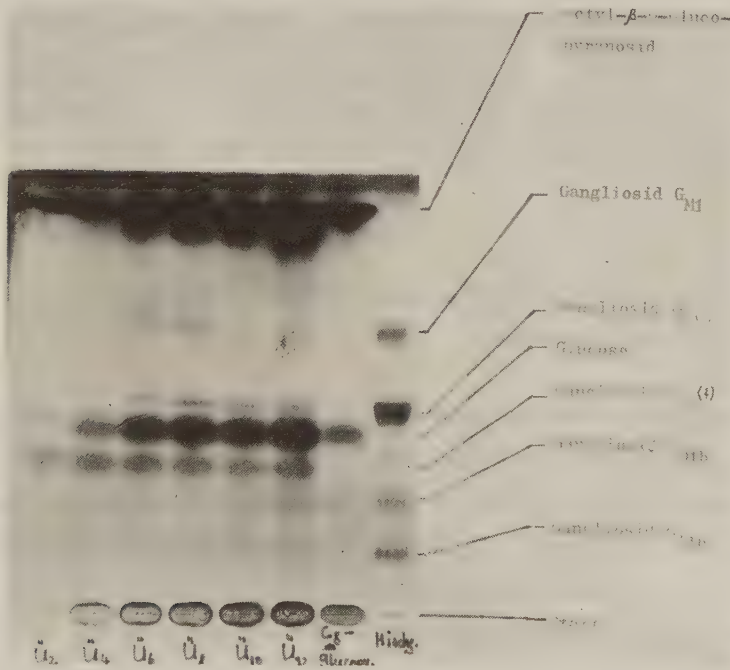


Abb. 28 Dünnsschichtchromatographische Lipidanalyse der 100.000 g Überstände (Ü) nach Extraktion von Mikrosomen mit Octyl-β-D-Glucopyranosid
Ganglios.Mischung ≙ Kontrollgemisch von Rinderhirngangliosiden; C₈-Glucopyr. ≙ Octyl-β-D-Glucopyranosid, käufliche Mischung; die Indices in den Überständen (Ü) entsprechen folgender Detergengkonzentrationen: 2 ≙ 5 mM; 4 ≙ 15 mM; 6 ≙ 20 mM; 8 ≙ 30 mM 10 ≙ 40 mM 12 ≙ 60 mM. Adsorbens: Kieselgel Fertigplatte von "Merck", Anfärbung: Käge-Miescher Sprühreagens, Laufmittel I vgl. Abschn. 5.

Wie vermutet wurde, werden nach den in Abb. 28 gezeigten Ergebnissen mit steigenden Detergensen Mengen in zunehmendem Maße Ganglioside aus den Mikrosomen nach der Zentrifugation in den 100.000 g Überstand extrahiert. So läßt sich bereits bei einer Konzentration von 5 mM Octyl- β -D-Glucopyranosid ein Gangliosid im Überstand nachweisen, das sich nur mit neueren Aufarbeitungsmethoden (145) im Rinderhirn nachweisen läßt. Nach einem Vergleich mit den Laufeigenschaften dieser Spurenkomponente in anderen Laufmitteln (145) dürfte es sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um das Gangliosid G_{D0} handeln, dessen Struktur sich aus dem Gangliosid G_{D1a} und einem zusätzlich endständig kovalent gebundenem Aminozucker ableiten läßt (145). Bei höheren Detergensenkonzentrationen in den Überständen (ab 20 und 30 mM Octyl- β -D-Glucopyranosid) lassen sich auch die Ganglioside G_{M1} (ein endogener Inhibitor der membrangebundenen Neuraminidase; vgl. Abschn. 2.2.4.) und das Neuraminidasesubstrat G_{D1a} in den Extrakten nachweisen.

2.2.11. Stabilität und säulenchromatographische Reinigungsversuche der extrahierten Neuraminidase

Im Gegensatz zu früher untersuchten Detergensextrakten der membrangebundenen Neuraminidase blieb die enzymatische Aktivität in den Überständen mit 20 bzw. 25 mM Octyl- β -D-Glucopyranosid bei 4°C über einen Zeitraum von zwei Tagen gegenüber den Substraten G_{D1a} und Sialyllactit konstant. Ein wesentliches Hindernis zur näheren Charakterisierung des membrangebundenen Enzyms- seine Labilität in Detergensenlösungen- schien damit erstmals überwunden zu sein. Dennoch stellten sich bei den nachfolgenden, ersten Reinigungsversuchen der Extrakte an Sepharose 4 B, DEAE-Sepharose und Octyl-Sepharose weitere Probleme, die bisher nicht erfolgreich gelöst werden konnten:

- 1) Die auf das Säulenmaterial aufgetragenen Proteinmengen lagen in zu hoher Verdünnung vor (≤ 0.5 mg Protein/ ml), so daß die Bestimmung des Protein- gehaltes in den resultierenden Eluatn (eluiert wurde mit 10 mM Tris/HCl- bzw. 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl- Puffer, pH = 7.2) unter die Nachweis-

grenze der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (146) fiel. In den Eluaten war eine enzymatische Aktivität gegenüber beiden Substraten nicht nachweisbar.

- 2) Versuche, die Extrakte durch partielles Gefriertrocknen oder Dialyse gegen destilliertes Wasser bei 4°C zu konzentrieren, führten zu einem irreversiblen Verlust an enzymatischer Aktivität oder einem Ausflocken von -enzymatisch ebenfalls inaktiven - Proteinpartikeln im Dialysegut. Auch Konzentrierungsversuche mit Ammoniumsulfatlösungen waren bisher erfolglos.

Es ist also zu vermuten, daß die Detergensmoleküle selbst einen Ersatz enzymstabilisierender Membrankomponenten darstellen. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob der Extraktion der membrangebundenen Neuraminidase durch Octyl- β -D-Glucopyranosid alternative Detergenzien oder enzymstabilisierende Membranlipide an die Seite gestellt werden können, um die Rolle dieses Schlüsselenzyms in neuronalen Geweben und seine Bedeutung für den Gangliosidabbau an gereinigten Enzympräparaten zu studieren.

3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

3.1. Pathobiochemische Untersuchungen

Eine Kurzzusammenfassung erfolgte bereits in Abschnitt 2.1.4. auf Seite 25.

Vererbare Defekte eines Enzyms aus der Gruppe der Neuraminidasen führen zu erhöhten Ausscheidungsraten von Sialyloligosacchariden im Patientenurin. Erst seit etwa drei Jahren sind derartige Enzymdefekte in der Literatur bekannt und mit unterschiedlicher klinischer Symptomatik beschrieben worden (81, 82). Somit ist klar, daß in jüngster Zeit immer häufiger Arbeiten mit varianten Sialidasedefekten veröffentlicht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß neben den bereits bekannten Krankheitsformen der Sialidosen Typ 1 und Typ 2 (151) auch Patienten mit den Symptomen der "adult type neuronal storage disease" als Träger eines Sialidasedefektes diagnostiziert werden können. Dieser Sialidasemangel bei ATNS-Patienten ließ sich allerdings nur unter Verwendung eines wasserlöslichen Substrates (Abb. 7, Seite 24) und allein an Fibroblastenkulturen des Patienten nachweisen.

Ähnliche Sialidasedefekte wurden ebenfalls nur an Fibroblastenkulturen von Patienten mit Mucopolipidose I, II und III und dem sog. "cherry red spot myoclonus syndrome" beschrieben (151). Offenbar ist dieser Mangel, wasserlösliche Substrate optimal umzusetzen, ein allgemeines Kennzeichen dieser Krankheiten, denn mit anderen, lipophilen Substraten (Gangliosid G_{D1a} und G_{M3}) wurde kein Mangel an Sialidaseaktivität gefunden, weder in Zellkulturen des ATNS-Patienten (Abb. 6, Seite 23), noch im Hirngewebe von Patienten mit Mucopolipidose I und II (Tab. 2, Seite 15). Allerdings zeigten die Untersuchungen in Zellkulturen, daß in Leukozyten allgemein die gangliosidspaltende Sialidaseaktivität um das mindestens Dreifache über der sialyllactitspaltenden Enzymaktivität liegt (Abb. 6, 7). Die vorgelegten Daten weisen deshalb auf die Existenz von mindestens zwei Sialidasen mit gleichem pH-Optimum hin (105), die beide offenbar in membranassoziierter Form vorliegen (vgl. Seiten 16, 23):

Eines dieser Enzyme erreicht seine höchste spezifische Aktivität in Fibroblasten, seine bevorzugten Substrate sind Sialyloligosaccharide, nach neueren enzymkinetischen Untersuchungen scheint es sich, wie bereits vermutet, um ein Enzym der Lysosomen zu handeln. In allen hier untersuchten Krankheiten ist dieses Enzym in seiner Aktivität bis über 90 Prozent reduziert (83, 151).

Das zweite Enzym ist vor allem im Nervengewebe lokalisiert und spaltet Gangliosidsubstrate unter den angegebenen Bedingungen mindestens dreimal schneller als wasserlösliche Substrate (vgl. Tab. 2,3, Seite 15, 16). Da unter den Testbedingungen die Konzentration des wasserlöslichen Substrates Sialyllactit zwanzigmal höher ist als die Gangliosidkonzentration von G_{D1a} (0.1 mM gegenüber 2 mM; vgl. Abschn. 5.2.3., 5.2.4.), wird das wasserlösliche Substrat offenbar ausschließlich von dem in der Plasmamembran der Nervenendigung lokalisierten Neuraminidase umgesetzt, deren bevorzugte Substrate Ganglioside sind. Dieses Enzym ist in allen drei untersuchten Krankheiten in aktiver Form vorhanden.

Da die spezifische Aktivität dieses zweiten Enzyms im Nervengewebe um den Faktor 25 über der fibroblastenspezifischen Sialidaseaktivität liegt, war es nicht möglich, im Hirngewebe der Patienten mit Mucopolidose I und II den Ausfall des Fibroblastenenzym nachzuweisen. Andere Untersuchungsmethoden, wie der Vergleich der Gangliosidmuster von Patienten- und Kontrollgeweben (Abb. 5, Seite 21), das vermehrte Auftreten des Sialidasesubstrates G_{T1b} und die Anhäufung löslicher Sialyloligosaccharide in den Patientengeweben (siehe Seite 21; vgl. hierzu Abschn. 5.4.), ergaben jedoch einen indirekten Hinweis auf den Ausfall eines Spurenenzyms im Nervengewebe.

Unter diesen Voraussetzungen sind die Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen lipid- und proteingebundener Sialsäure jedoch nicht interpretierbar (Abb. 4, Seite 20), denn der Ausfall einer Spuren-Sialidase im Gehirn der Patienten mit Mucopolidose I und II sollte bei beiden Krankheiten zu einer gleichsinnigen Erhöhung des Sialsäuregehaltes führen. Hier müssen

weitere Untersuchungen klären, ob die in Abb. 4 (Seite 20) gezeigten Verteilungsmuster der lipid- und proteingebundenen Sialsäure Charakteristika der Krankheiten darstellen, oder ob die Werte noch innerhalb der biologischen Variationsbreite liegen.

Die Untersuchung weiterer, lysosomaler Enzymaktivitäten hatte ergeben, daß im Mucopolidose II-Gewebe eine Reihe saurerer Hydrolaseaktivitäten deutlich (bis zu 25 % Restaktivität) verringert waren (Tab. 4,5; Seite 17,18).

Offenbar ist diese Reduzierung mehrerer Enzymaktivitäten für die Mucopolidose II typisch, da andere Autoren auch an Fibroblastenkulturen ähnliche Ergebnisse erhalten hatten (90). Als primäre Schlüsselstelle für diese Defekte vermuteten Kress et al. (152) eine Veränderung oder einen Ausfall der Mannosidaseaktivität, die bei der Biosynthese der Enzyme zu einer veränderten Sequenz in der Zuckerstruktur führt, so daß derartig mutierte Glycoproteine nicht mehr in ihr entsprechendes Zellkompartiment eingebaut werden können. Diese Vermutung ließ sich jedoch nach den in Tab. 5 (Seite 18) gezeigten Daten nicht bestätigen, da sowohl die bei pH 6.0 (Golgi-Apparat-assoziierte Mannosidaseaktivität, stimulierbar durch Co^{2+} -Ionen) als auch die bei pH 4.0 (Mannosidaseaktivität der Lysosomen, inhibierbar durch Co^{2+} -Ionen) beobachteten Enzymaktivitäten vorhanden waren. Die Normalaktivität bei pH 4.0 widerspricht nicht der Verminderung der Golgi-assoziierten Mannosidaseaktivität bei pH 6.0, sondern weist vielmehr darauf hin, daß zwischen den unterschiedlichen Einfrierlabilitäten und einen primären Enzymdefekt streng zu unterscheiden ist (siehe auch nächster Absatz; (105)). So wird bei der Mucopolidose I der primäre Defekt einer lysosomalen Sialidaseaktivität inzwischen allgemein anerkannt (151).

Anders ist dies bei nicht eindeutig geklärten Krankheitsformen, wie z. B. bei der Mucopolidose II. So hatten Untersuchungen von O'Brien et al. (151) vor kurzem zeigen können, daß die Abbauraten eines synthetischen, wasserlöslichen Substrates in Mischpopulationen von Kontrollfibroblasten mit Zellen der Sialidose Typ 1 und 2 nicht durch endogene, wasserlösliche Siali-

daseinhibitoren beeinträchtigt werden. Auch zeigten Mischversuche von pathologischen Fibroblastenkulturen untereinander (Typ 1 mit Typ 2) nur die Summe der Einzelaktivitäten, d.h. die Menge an Enzymprotein pro Zellkompartiment scheint verringert zu sein. Damit stellt sich die bisher nicht geklärte Frage ob die defekten Enzyme überhaupt synthetisiert oder nur mit einer "falschen" Signalsequenz ausgestattet sind. So hatten Strecker et al. vermutet (153), der primäre Defekt bei der Mucopolidose II sei in einer "Über-Sialisierung" lysosomaler Enzyme begründet, die einer Pinozytose in die Lysosomen entgegenwirkt. Sie begründeten diese Beobachtung mit dem Auftreten dieser Enzyme im Kulturmedium von pathologischen Fibroblasten. Dies ließ sich nach neueren Untersuchungen zwar nicht bestätigen, da Spritz et al. auch nach der Behandlung dieser Enzyme mit bakterieller Neuraminidase keinen normalen Einbau in die Lysosomen beobachten konnten. (154), jedoch scheinen andere Enzymsysteme bei dieser Krankheit verändert zu sein: So hatten Hasilik und Neufeld (111 a) vor kurzem gefunden, daß die Überführung enzymatisch inaktiver Proenzyme durch Phosphorylierung der terminalen Mannosereste bei der ML II in enzymatisch aktive Enzymproteine unterbleibt. Damit könnte auch die Golgi-assoziierte Mannosidase in ihrer Aktivität herabgesetzt sein (vgl. Tab. 5, Seite 18). Dies muß jedoch weiter untersucht werden.

Eine weitere Arbeit (155) konnte darüberhinaus die in der vorliegenden Studie gezeigten Ergebnisse zur Organspezifität der Sialidasen nachträglich bestätigen:

So zeigten Fibroblasten bei einem von Den Tandt et al. (155) untersuchten Mucopolidose II-Patienten nur 2 Prozent Restaktivität an Neuraminidase (getestet mit einem wasserlöslichen Substrat), während Leukozyten eine vollkommen normale Neuraminidaseaktivität besaßen. Außerdem weisen die Autoren auf eine hohe Einfrierlabilität dieser Neuraminidaseaktivität hin, die sich möglicherweise auch in der Tab. 3 (vgl. hierzu Seite 14,16) widerspiegelt. Der primäre Defekt bei der Mucopolidose II gilt derzeit als noch nicht geklärt.

Als Zusammenfassung der pathobiochemischen Untersuchungen läßt sich feststellen, daß bei Sialidosen vor allem der Abbau wasserlöslicher Substrate - nachgewiesen bei einem ATNS-Patienten - nicht jedoch der Umsatz von Oligosialylgangliosiden gestört ist. Dies erscheint vor allem deshalb bemerkenswert, weil damit eindeutig gezeigt werden konnte, daß sich der erste Abbauschritt im Gangliosidmetabolismus, nämlich die Abspaltung endständig gebundener Neuraminsäure, prinzipiell von den Abbaumechanismen der Ganglioside ohne endständige Sialsäure zu unterscheiden scheint. Diese werden im Lysosom (114) von verschiedenen Hydrolasen mit ebenfalls sauerem pH-Optimum gespalten, die Poly- und Oligosialylganglioside jedoch in der Plasmamembran, dem Wirkungsort der membrangebundenen Neuraminidase, abgebaut. Vorstellungen über die Wechselwirkung dieses Enzyms mit seinen Substraten sollen an Hand der vorgelegten Daten im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

3.2. Enzymkinetische Untersuchungen

3.2.1. Lipide als Partner membrangebundener Enzyme

Die Bedeutung der Lipidphase für eine optimale Funktion membrangebundener Enzyme ist heute unbestritten. Obwohl für eine direkte, molekulare Bindung von Lipiden an membrangebundene Enzyme in der lebenden Zelle noch eindeutige Beweise fehlen, konnte an gereinigten Enzymen in künstlichen Lipidphasen gezeigt werden, daß z.B. der Cytochrom C Oxidase-Komplex der Mitochondrien Lipide mit einer hohen Affinität zu binden vermag (156). Insbesondere für die β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase der Mitochondrienmembran wurde dargelegt, daß diese Enzym nur in Gegenwart der Cholineinheit von Phospholipiden seine katalytische Aktivität entfalten kann (157). Auch die Ca^{2+} , Mg^{2+} -abhängige ATPase des sarcoplasmatischen Reticulum benötigt für eine maximale enzymatische Aktivität in vitro einen Lipidannulus von etwa 30 Phospholipiden je Proteineinheit (158). Da Veränderungen in der hydrophoben Phase von Lipiden offenbar auch die Hydrathülle im hydrophilen Lipid-

bereich beeinflussen (159, 160), wird vermutet, daß durch Veränderung in der Lipidzusammensetzung biologischer Membranen auch die Membranfluidität und durch sie die Enzymaktivität membrangebundener Enzyme reguliert wird (161). Da bei diesen Untersuchungen vor allem Enzyme studiert wurden, die die Umsetzung wasserlöslicher Substrate katalysieren, stellt sich die Frage, wie der Abbau membrangebundener Substrate durch membrangebundene Enzyme reguliert wird.

2.2. Die Wechselwirkung der membrangebundenen Neuraminidase mit wasserlöslichen und Lipid-Substraten

Während bei den obengenannten Enzymsystemen eine Verminderung der katalytischen Aktivität konsequenterweise eine Erniedrigung des Substratumsatzes nach sich zog, schien sich die membrangebundene Neuraminidase des Kalbshirnes gerade umgekehrt zu verhalten: die Basisaktivität des Enzyms (getestet mit dem wasserlöslichen Substrat Sialyllactit) wurde durch bestimmte Zusätze (z.B. Anästhetika oder spezielle Gase) herabgesetzt oder blieb unbeeinflusst, bei Abbaustudien mit einem Gangliosidsubstrat waren die Umsatzraten jedoch erhöht. Es war also zunächst zu klären, ob beide Substrate überhaupt von demselben Enzymprotein gespalten wurden. Dafür gibt es folgende Argumente:

- a) Die Untersuchungen zur Puffer- und pH-Abhängigkeit (Abschn. 2.2.5., 2.2.6., Seite 43, 45) hatten dargelegt, daß beide Substrate bei pH=4 optimal gespalten werden.
- b) Das Auftreten unterschiedlicher Isoenzyme mit identischem pH-Optimum aber hoher spezifischer Affinität zu nur einem der beiden Substrate ist sowohl wegen bereits früher durchgeführten Messungen zur Substratspezifität als auch wegen der Daten zur Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des Inkubationspuffers (Abb. 18, Seite 46) sowie der Ionenabhängigkeit (Abschn. 2.2.7., Seite 49) unwahrscheinlich. Auch eine durch Ca^{2+} -Ionen stimulierbare, lösliche Neuraminidase (139) ist in den verwendeten Mikrosomen nicht enthalten.
- c) Bei Zusatz von bestimmten Reinlipiden wird die Umsatzgeschwindigkeit beider Substrate zwar in unterschiedlichem Maße, jedoch in gleichsinniger Weise beeinflusst (Abschn. 2.2.8., Seite 51).

d) Schließlich hatten auch die Extraktionsstudien mit Octyl- β -D-Glucopyranosid (Abschn. 2.2.10., Seite 65) keinerlei Hinweise für das Auftreten verwandter Isoenzyme mit identischem - oder im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht signifikant unterschiedlichem - pH-Optimum erbringen können.

Die Unterschiede in der inhibitorischen Wirksamkeit verschiedener Glycolipide und Glycolipidderivate gegenüber beiden Substraten (Abschn. 2.2.4., Seite 38, Tab. 6, Seite 41) waren jedoch im Falle des Glycolipids G_{A2} so deutlich ausgeprägt, daß sowohl nach den hier vorgelegten wie auch bereits früher veröffentlichten Ergebnissen (86) eine hydrophobe Bindungsstelle am Enzymprotein für dieses Glycolipid postuliert wurde.

3.2.5. Die hydrophobe Bindungsstelle der membrangebundenen Neuraminidase

Nach eigenen Untersuchungen waren erstmals Hinweise erbracht worden, daß endogene Inhibitoren der membrangebundenen Neuraminidase existieren (84). Es handelt sich dabei offenbar nicht um wasserlösliche Neuraminsäurereste oder Sialyloligosaccharide, sondern vielmehr um lipidgebundene Produkte der enzymatischen Reaktion, die Glycolipide ohne einen endständigen Sialsäurerest. Wahrscheinlich sind neben dem Glycolipid G_{A2} , dem bereits erwähnten kompetitiven Inhibitor der G_{D1a} -Spaltung, auch andere Lipide potentielle Inhibitor-kandidaten (z.B. Sphingomyelin, Lecithin und Kephalinge, siehe Abschn. 2.2.8., Abb. 21, Seite 54).

Damit könnte die membrangebundene Neuraminidase einen ähnlichen Lipidannulus in ihrer natürlichen Umgebung benötigen, wie er bereits für andere membran-gebundene Enzyme beschrieben wurde (vgl. Abschn. 3.2.1.). Dies ist jedoch in einer rohen Enzympräparation wie Mikrosomen sicher nicht zu beweisen, allerdings gibt es inzwischen andere Hinweise für die Richtigkeit dieser Behauptung: So hatte Hakomori (462) vor kurzem berichtet, daß in nahezu allen Extrakten, aus denen Ganglioside in Reinsubstanz dargestellt werden (Chloroform/Methanol-, Aceton-, Methanol/Acetat-Lösungen) zusammen mit den Gangliosiden niedermolekulare Polypeptide extrahiert werden, die als "gangliophil" bezeichnet wurden. Diese Polypeptide ($M \sim 5000$) binden an Ganglioside mit erstaun-

lich hoher Affinität und sind durch Pronase spaltbar. Es wird vermutet, daß diese Substanzen auch an andere Glycolipide binden könnten, z.B. das Glycolipid G_{A2} (79, 163). Da andererseits bisher keine Bindung an Sialyloligosaccharide festgestellt wurde (163), könnte die unterschiedliche Inhibitorspezifität der membrangebundenen Neuraminidase gegenüber G_{D1a} und Sialyllactit durch diese, an Glycolipide bindenden Polypeptide hervorgerufen werden, die eine hydrophobe Bindungsstelle am Enzym vortäuschen könnten. Wenn auch über die subzelluläre Verteilung dieser gangliophilen Polypeptide noch keine Erkenntnisse vorliegen, so darf eine benachbarte Lokalisation dieser Substanzen zu Gangliosiden und die sie abbauenden Enzyme zumindest unterstellt werden. Damit lassen sich jedoch nicht nur die Unterschiede in der Affinität zu Mikrosomen zwischen dem wasserlöslichen und dem lipophilen Substrat besser interpretieren, auch die höhere Spezifität des Enzyms zu lipophilen Inhibitoren wird nun verständlicher.

3.2.4. Die Wirkung membranfluidisierender Agenzien auf die Umsatzraten der Neuraminidasesubstrate

Unterstellt man also, daß beide Substrate (Gangliosid G_{D1a} und Sialyllactit) von demselben Enzym erkannt und abgebaut werden, so stellt sich die Frage, wie die Erhöhung der Gangliosidspaltung in Gegenwart geringer Anästhetikakonzentrationen oder membranfluidisierender Lipide zu erklären ist. Testet man die Basisaktivität des Enzyms mit Sialyllactit als Substrat, so wird die katalytische Aktivität durch Halothan oder Diäthyläther (Abschn. 2.2.2., Seite 32, Abschn. 2.2.3., Seite 36) oder durch die Lipide Dimiristoyllecithin sowie Lysolecithin (Abschn. 2.2.8., Seite 51; Abb. 22, Seite 55) nur wenig herabgesetzt oder sogar bis auf die Hälfte reduziert (z.B. durch erhöhte Drucke von Lachgas, Abb. 18, Seite 46, 47). Andere membrangebundene Enzyme, die wasserlösliche Substrate umsetzen, verhalten sich ebenso (115). Für die Erhöhung der Gangliosidspaltung unter diesen Bedingungen mußte also ein Membranparameter verantwortlich sein, der die Verminderung der enzymatischen Basisaktivität überkompensieren konnte, z.B. die durch Anästhetika und be-

stimmte Lipide erhöhte Membranfluidität.

So wurde zunächst die Brauchbarkeit der Fluiditätsbestimmung mit dem Membranmarker DPH an Liposomen aus Lecithin (Abschn. 5.5.2., Seite 400) und Sphingomyelin (Abb. 12, Seite 34) überprüft und auf Mikroviskositätsmessungen in Mikrosomensuspensionen übertragen (Abb. 13, Seite 35). Im weiteren Verlauf wurde gezeigt, daß sogar Halothankonzentrationen im klinisch verwendeten Bereich zu einer meßbaren Erhöhung der Membranfluidität und einer deutlichen Stimulierung der Gangliosidspaltung beitragen (Abb. 14, Seite 36). Wenn auch die vorgelegten Meßdaten für eine quantitative Korrelation zwischen der Stimulierung der Gangliosidspaltung und der Fluiditätserhöhung nicht ausreichten, so konnte G. Scheel zeigen, daß sich auch die in vitro Messungen am Modellsystem der membrangebundenen Neuraminidase mit physiologischen Anästhesieparametern vergleichen lassen. So wurde eine überraschend gute Übereinstimmung zwischen den "nerve blocking concentrations" verschiedener Alkohole (464) und der Stimulierung des Gangliosidabbaus von G_{D1a} um einen Betrag von etwa 15 Prozent erhalten (87, 465). Auch R. Pellkofer fand danach eine deutliche Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit von Sphingomyelin (getestet mit der Sphingomyelinase der Plasmamembran) in Gegenwart klinisch verwendeter Halothankonzentrationen (88).

Aus diesen Beobachtungen läßt sich ein möglicherweise allgemeingültiges, membranenzymologisches Konzept ableiten, das unterschiedliche Eigenschaften wasserlöslicher und membrangebundener Substrate und ihre Wechselwirkung mit membrangebundenen Enzymen verknüpft:

Die hohe Affinität lipophiler Substrate zu Membranphasen führt zu einer, der eigentlichen enzymatischen Reaktion vorgelagerten Lateraldiffusion in der Membranebene. Von Fluiditätsveränderungen in dieser Lipidphase profitieren membrangebundene Substrate membrangebundener Enzyme stärker als wasserlösliche Substrate. Die Gründe hierfür sind in den physiko-chemischen Voraussetzungen der Lipidsubstrate festgelegt und konzentrieren diese Substanzen in der Nähe der membrangebundenen Enzymproteine, außerdem scheinen spezifische Bindungs-

affinitäten der Membrankomponenten untereinander zu existieren (162). Bei der Bestimmung von Substratspezifitäten in diesen Systemen ist deshalb darauf zu achten, daß Michaeliskonstanten für membrangebundene Substrate einen diffusionsabhängigen Faktor D enthalten:

$$K_M (\text{wahr}) = D \cdot K_M (\text{beobachtet})$$

Erste Messungen am vorgestellten System scheinen diesen Zusammenhang zu bestätigen (87). Die Verknüpfung von D mit der Mikroviskosität ergibt nur in Membranen mit bekannten strukturellen Parametern einfache Gleichungssysteme. Allgemein ist die Mikroviskosität jedoch nach (118) formulierbar,

$$\bar{\eta} = A \cdot e^{E_A/RT}$$

wobei $\bar{\eta}$ in dem strukturellen Faktor A enthalten ist. E_A stellt den Energiebetrag dar, der für die Lateraldiffusion eines Lipids in der Membranebene zum Ort der enzymatischen Reaktion aufgebracht werden muß, R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur.

Weitere Untersuchungen müssen klären, ob sich laterale Diffusionskoeffizienten für Ganglioside in intakten biologischen Membranen bestimmen lassen.

3.2.5. Die Bedeutung der Fluidität für biologische Membranen

Wie bereits erwähnt, erreicht die membrangebundene Neuraminidase ihre höchste spezifische Aktivität in den synaptischen Membranen der Nervenendigung, die besonders reich an Gangliosiden sind. Mehrere Untersuchungen (166,167,168) konnten die Vermutung erhärten, daß die Nervenendigung der eigentliche Wirkungsort vieler Anästhetika und psychotisch wirkender Drogen ist. Die Herabsetzung der Fluidität neuronaler Membranen durch Morphin (sowohl in vitro als auch in vivo) deutet darauf hin (169), daß auch meßbare Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Membranbausteine zu erwarten sind. So wurde vor kurzem berichtet (170), daß Opiate und Enkephaline die Biosynthese von Gangliosiden signifikant erniedrigen, während die Zusammensetzung der übrigen Membranlipide nicht beeinflußt werden soll. Diese in N4TG1-Tumorzellen der Maus durch-

geführten Messungen scheinen sich jedoch nicht ohne Einschränkungen auf gesunde Gewebe anderer Vertebraten übertragen zu lassen, da erste eigene Messungen des Gangliosidgehaltes in postmortalen Geweben Morphinsüchtiger (vgl. Abschn. 5.12., Seite 105) keine Erniedrigung oder meßbare Veränderung im Gangliosidmuster gegenüber Kontrollgeweben feststellen konnten. Diese Tatsache ist inzwischen bestätigt worden (171).

Auch Lectine von Säugern können die Fluidität in Zellmembranen durch sog. "capping"-Phänomene herabsetzen. Es ist bekannt, daß diese Glycoproteine an bestimmte Ganglioside auf der Zelloberfläche binden und folglich die Mobilität bestimmter Glycolipide beeinträchtigen werden (172). Für eine lectinähnliche Untereinheit des Cholera-Toxin wurde eine eindeutige, spezifische Bindung an das Gangliosid G_{M1} , einen endogenen Inhibitor der membran gebundenen Neuraminidaseaktivität, und eine Herabsetzung der Zellmobilität eindeutig nachgewiesen (173). Wie die Aktivität der membrangebundenen Neuraminidase von dieser Toxinbindung beeinflusst wird, ist bisher nicht untersucht worden.

Die Viskosität in synaptosomalen Membranen von Fischen wird durch Veränderung in der Lipid- und Gangliosidzusammensetzung den Temperaturen des jeweiligen Lebensraumes angepaßt (174, 175), auch existieren Hinweise darauf, daß das Gehirn von Alkoholikern eine andere Membranfluidität auf Grund veränderter Lipidmuster im Vergleich zu Normalpersonen besitzt (176).

Diese ausgewählten Beispiele sollten zeigen, daß sich in neuerer Zeit viele Verknüpfungspunkte zwischen der Fluidität biologischer Membranen und ihrem Gangliosidgehalt herstellen lassen. Waren also die verwendeten Mikrosomen zur Klärung einiger membranenzymologischer Prozesse geeignet oder sind dienach d vorliegenden Daten nur indirekt erbrachten Hinweise auf veränderte Lateral- diffussionen membrangebundener Substrate nicht haltbar? Bei der Interpretation der Daten zur Erhöhung der Membranfluidität und der Stimulierung des Gangliosidabbaus von G_{D1a} war davon ausgegangen worden, daß die zugesetzten Gangliosidmizellen mit der Mikrosomenmembran fusionieren und lateral diffundieren. Die in Abschn. 2.2.9 (Seite 57) gezeigten Ergebnisse über den Einbau mizella-

rer Ganglioside konnten dies nur für einen Teil der zugesetzten Substrat-mizellen oder Glycolipide wahrscheinlich machen, jedoch nicht beweisen. Es wurde wiederholt bezweifelt, daß exogene Ganglioside als funktionell intakte Moleküle in Membranphasen subzellulärer Präparationen eingebaut (177) werden können. Keenan selbst (178) hat dies vor kurzem nochmals betont, obgleich er an Fibroblastenhomogenaten nahezu identische Ergebnisse wie die hier vorgestellten erhalten hatte. Gegensätzliche Meinungen (179) machen allerdings deutlich, wie "rudimentär" auch heute noch (1) die Kenntnisse auf diesem Gebiet sind. Nur durch praktische, experimentelle Arbeit werden sich die offenen Fragen klären lassen. Die Extraktionsversuche zur näheren Charakterisierung (Abschn. 2.2.10, Seite 65) der membrangebundenen Neuraminidase lassen darüberhinaus hoffen, in Zukunft an gereinigten Präparationen die Rolle dieses Schlüsselenzyms im Abbaumechanismus der Ganglioside deutlicher als bisher verstehen zu lernen.

Dies erscheint nicht nur aus der Sicht der biochemischen Grundlagenforschung über biologische Membranen wünschenswert, sondern wird auch zur Klärung der physiologischen Funktion der Ganglioside im gesunden Organismus, aber auch bei den bekannten enzymatischen Defekten lysosomaler Neuraminidasen beitragen.

Eine der interessantesten Fragen, die in diesem Zusammenhang zu klären sein werden, liegt der Beobachtung zugrunde, daß die Substrate der membrangebundenen Neuraminidase erst bei relativ niedrigen pH-Werten in vitro vom Enzym gespalten werden. Für ein Enzym der Plasmamembran der Nervenendigung sollte eher ein neutrales pH-Optimum zu erwarten sein (126). Andererseits existieren gerade bei diesen niedrigen pH-Werten Hinweise auf eine Lactonisierung der Carboxylgruppe von Neuraminsäureresten mit einer benachbarten Hydroxylgruppe der Glycocalix von Glycolipiden oder Glycoproteinen (180,181). Die dadurch mögliche Freisetzung von Calcium-Ionen an der Oberfläche der Nervenendigungs-membran verdichten die seit längerer Zeit bestehende Vermutung, daß Ganglioside indirekt mit anderen Enzymsystemen der Zelle gekoppelt sind (182). Vielleicht liegt darin das eigentliche Geheimnis der physiologischen Funktionen der Sialylglycosphingolipide begründet.

4. Literaturverzeichnis

- 1) Singer S.J., Nicolson G.L. Science 175, 720 (1972)
- 2) Thudichum J.L.W. Report Med.Of.Priv.Council 3 (1874)
- 3) Neurath H. The Proteins, S. 937 ff. Academic Press, New York (1963)
- 4) Thudichum J.L.W., Drabkin L. Historical Introduction zu "A Treatise on the chemical constitution of the brain" Archon Books, Hamden, Connecticut (1962)
- 5) Klenk E. Z.Physiol.Chem. 235, 24 (1935)
- 6) Klenk E. Z.Physiol.Chem. 273, 76 (1942)
- 7) Blix G. Z.Physiol.Chem. 240, 43 (1936)
- 8) Rosenberg A., Schengrund C.-L. Biological roles of sialic acid, Plenum Press, New York and London (1976) S. 22-39
- 9) Karlson P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 10.Auflage (1977)
- 10) Carubelli R., Trucco R.E., Caputto R. Biochim.Biophys.Acta 60, 196 (1962)
- 11) Svennerholm L. Meth.Carb.Chem. Vol. VI, 464, Acad. Press New York (1970)
- 12) Iwamori M., Nagai Y. Biochim.Biophys.Acta 528, 257 (1978)
- 13) Morgan E.H., Laurell C.-B. Nature 197, 921 (1963)
- 14) Leibovitz Z., Gatt S. Biochim.Biophys.Acta 152, 136 (1968)
- 15) Tettamanti G., Zambotti V. Enzymologia 35, 61 (1968)
- 16) Tettamanti G., Lombardo A., Preti A., Zambotti V. Enzymologia 39, 65 (1970)
- 17) Öhman R., Rosenberg A., Svennerholm L. Biochemistry 9, 3774 (1970)
- 18) Gielen W., Harprecht V. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 350, 201 (1969)
- 19) Schengrund C.-L., Rosenberg A. J.Biol.Chem. 245, 6196 (1970)
- 20) Mahadevan S., Nduaguba J.C., Tappel A.L. J.Biol.Chem. 242, 4409 (1967)
- 21) Tulsiani D.R.P., Carubelli R. J.Biol.Chem. 245, 1821 (1970)
- 22) Tulsiani D.R.P., Carubelli R. Biochim.Biophys.Acta 284, 257 (1972)
- 23) Schengrund C.-L., Jensen D.S., Rosenberg A. J.Biol.Chem. 247, 2742 (1972)
- 24) Visser A., Emmelot P. J.Membrane Biol. 14, 73 (1973)
- 25) Kishore G.S., Tulsiani D.R.P., Bhavanandan V.P., Carubelli R. J.Biol.Chem. 250, 2655 (1975)
- 26) Kuratowska Z., Kubicka T. Acta Biochim.Polonica 14, 255 (1967)
- 27) Unbehauen V. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351, 705 (1970)

- 28) Tulsiani D.R.P., Carubelli R. Biochim.Biophys.Acta 227, 139 (1971)
- 29) Yeh A.K., Tulsiani D.R.P.,
Carubelli R. J.Lab.Clin.Med. 78, 771 (1971)
- 30) Tulsiani D.R.P., Nordquist R.E.,
Carubelli R. Exp.Eye Res. 15, 93 (1973)
- 31) Tallman J.F., Brady R.O. Biochim.Biophys.Acta 293, 434 (1973)
- 32) Bosmann H.B. Biochim.Biophys.Acta 279, 456 (1972)
- 33) Kuhn R., Brossmer R. Chem.Ber. 92, 1667 (1959)
- 34) Wiegandt H. Angew.Chem. 80, 89 (1968)
- 35) Rouser G., Galli C., Lieber E.J. Am.Oil Chem.Soc. 41, 836 (1964)
- 36) Eldredge G., Read G., Cutting W. Med.Ext'l. 8, 265 (1963)
- 37) Rahmann H., Rösner H., Breer H. Verh.Dtsch.Zool.Ges. 67, 237 (1975)
- 38) Puro K., Maury P., Huttenen J.K. Biochim.Biophys.Acta 187, 230 (1969)
- 39) Long C., Staples D.A. Biochem.J. 73, 385 (1959)
- 40) Wolfe L.S. Biochem.J. 79, 348 (1961)
- 41) De Robertis E., Pellegrino de
Iraldi A., Rodriguez G., Sla-
ganikoff L. J.Neurochem. 9, 23 (1962)
- 42) Seminario L.M., Hren M.,
Gomez C.J. J.Neurochem. 11, 197 (1964)
- 43) Kornguth S.S. Rev. Neurosci. 1, 63 (1974)
- 44) Lapetina E.G., Soto E.F.,
De Robertis E. Biochim.Biophys.Acta 135, 33 (1967)
- 45) Brunngraber E.G., Dekrimenjian H.
Brown B.D. Biochem.J. 103, 73 (1967)
- 46) Avrova N.F. Zh.Evol.Biokhim.Fiziol. 4, 128 (1968)
- 47) Avrova N.F., Chenykaeva E.Yu.,
Obukhova E.L. J.Neurochem. 20, 997 (1973)
- 48) Uhlenbruck G. Acta Neuro.Latinoamer. 11, 205 (1965)
- 49) Berry J.F., Fletcher T.F.,
Bovis M. Lipids 4, 623 (1969)
- 50) Sunder-Plasmann M., Bernheim
mer H. Acta Neuropathol. 27, 289 (1974)
- 51) Kostic D. Acta Med.Jugoslav. 30, 369 (1976)
- 52) Rajalakshmi R., Naktraji H.L. J.Neurochem. 24, 979 (1975)
- 53) Geel S.E., Dreyfus P.M. J.Neurochem. 24, 353 (1975)
- 54) Dreyfus P.M. in "Thiamine", New York, Wiley, 229 (1976)
- 55) Kloppel T.M., Morrè D.J.,
Jacobsen L.B. J. Supramol.Struct. 11, 485 (1979)
- 56) Hakomori S. Adv.Canc.Res. 18, 265 (1974)

- 57) Richardson C.L., Baker S.R.,
Morré D.J., Keenan T.W. Biochim.Biophys.Acta 417, 175 (1975)
- 58) Paglini S., Zapata T.M. Acta Physiol.Lat.Am. 25, 188 (1976)
- 59) Formisano S., Johnson M.L., Lee G.,
Aloj S.M., Edelhoof H. Biochem. 18, 1119 (1979)
- 60) Mraz W., Schwarzmann G., Sattler J.,
Seeman B., Momoi T., Wiegandt H. in "Glycoconjugates", Hrsg. Schauer R.,
Boer P., Buddecke E., Kramer M.F., Vlieg-
genthart J.F.G., Wiegandt H.; Thieme
Verlag, Stuttgart, 112 (1979)
- 61) Harzer K., Jatzkewitz H., Sand-
hoff K. J.Neurochem. 16, 1279 (1969)
- 62) Holm M., Manson J.E. FEBS Lett. 45, 159 (1974)
- 63) Ledeen R.W. J.Supramol.Struct. 8, 1 (1978)
- 64) Tauc L., Hinzen D.H. Brain Res. 80, 340 (1974)
- 65) Chichua A.I. Izv.Acad.Nauk.Gruss.SSR, Ser.Biol.
3, 310 (1977)
- 66) Brunngraber E.G., Ziboh V.A. Lipids 9, 641 (1974)
- 67) Stoeckel K., Schwab M., Thoenen H. Brain Res. 132, 273 (1977)
- 68) van Heiningen S. Biol.Revs. 52, 509 (1977)
- 69) Bennet V., Cuatrecasas P. Life Sci. 21, 1649 (1977)
- 70) Mullin B.R. Science 199, 77 (1978)
- 71) Poss A., Deleers M., Ruysschaest
J.M. FEBS Lett.86, 160 (1978)
- 72) Cecarelli B. Adv.Exp.Med.Biol. 71, 275 (1976)
- 73) Aporti F., Finesso M. Med.Lav. 68, 296 (1977)
- 74) Negrin P., Fardin P. Min.Med. 69, 3277 (1978)
- 75) Sharom F.J., Grant C.M.W. Biochim.Biophys.Acta 507, 280 (1978)
- 76) Geiger B., Smolarsky M. J.Immunol.Meth. 17, 7 (1977)
- 77) Smolarsky M., Teitelbaum D.,
Sela M., Gitler C. J.Immunol.Meth. 15, 255 (1977)
- 78) Arnon R., Crisp E., Kelly R.,
Ellison G.W., Lawrence W., Tour-
tellotte W.W. J.Neurol.Sci 46, 179 (1980)
- 79) Sonnino S., Ghidoni R., Marchesi-
ni S., Tettamanti G. J.Neurochem. 33, 117 (1979)
- 80) Volk W.B., Schneck L. "The Gangliosidoses" Plenum Press ,
New York/London (1975)
- 81) Strecker G., Michalski J.C.,
Montreuil J., Parriaux J.P. Biomedicine 25, 723 (1976)

- 82) Cantz M., Gehler J., Spranger J. Biochim.Biophys.Res.Comm. 74, 723 (1977)
- 83) Miyatake T., Atsumi T., Obayashi T.,
Mizuno Y., Ando S., Ariga T., Matsui-
Nakamura K., Yamada T. Ann.Neurol. in Vorbereitung (1980)
- 84) Pallmann B. "Studien über die membrangebundene
Neuraminidase", Diplomarbeit Universität
München (1977)
- 85) Sandhoff K., Pallmann B., Wiegandt
H., Ziegler W. in "Enzymes of Lipid Metabolism", Hrg.
Gatt S., Freysz L., Mandel P., Ple-
num Publish.Corp., 463 (1978)
- 86) Sandhoff K., Pallmann B. Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 122 (1978)
- 87) Scheel G. "Die membrangebundene Neuraminidase als
Studienmodell für die Wirkungsweise
anästhetischer Agentien", Diplomarbeit
Universität München (1978)
- 88) Pellkofer R., Sandhoff K. J. Neurochem. 34, 988 (1980)
- 89) Spranger J., Gehler J. Cantz M. Am.J.Med.Genet. 1, 21 (1977)
- 90) Wenger D.A., Tarby T.J., Wharton C. Biochem.Biophys.Res.Comm. 82, 589 (1978)
- 91) Kaplan A., Achord D.T., Sly W.S. Proc.Natl.Acad.Sci. 74, 2026 (1977)
- 92) Ullrich K., Mersmann G., Weber E.,
v. Figura K. Biochem.J. 170, 643 (1978)
- 93) Spranger J., Wiedemann H.R., Tolks-
dorf M., Graucob E., Caesar R. Z. Kinderheilkunde 103, 285 (1968)
- 94) Coppa G., Sani S., Paris D.,
Gabrielli O., Marionara A. in "Perspect.Inher.Metab.Dis.II", Hrg.
Berra B. et al. Edi Ermes Publ.Mailand,
im Druck (1980)
- 95) Christomanou H., Cap C., Sand-
hoff K. Neuropädiatrie 8, 238 (1977)
- 96) Maire I., Zobot M.T., Mathieu M.,
Cotte J. J.Inher.Metab.Dis. 1, 19 (1978)
- 97) Tettamanti G., Bonalti F.,
Marchesini S., Zambotti V. Biochim.Biophys.Acta 296, 160 (1973)
- 98) Schraven J., Cap C., Novozcek G.,
Sandhoff K. Anal.Biochem. 78, 333 (1977)
- 99) Berra B., Cestaro B., Omodeo-Sale F.,
Venerando B., Beltrane D., Can-
tone A. Bull.Mol.Biol.Med. 3, 86 (1978)
- 100) Warren L. J.Biol.Chem. 234, 1971 (1959)
- 101) Humbel R., Collart M. Clin.Chim.Acta 60, 143 (1975)

- 102) Kelly T.E., Graetz G. Am.J.Med.Genet. 1, 31 (1977)
- 103) Loonen M.C.B., Lugt L.V.D., Frank C.L. Lancet 2, 785 (1974)
- 104) Sogg R.L., Steinmann L., Rathieu B., Sharp B., O'Brien J.S. Am.J.Ophthalmol. 12, 243 (1978)
- 105) Lowden J.A., O'Brien S.J. Am.J.Hum.Genet. 31, 1 (1979)
- 106) Rapin I, Goldfischer S., Katzmann R., Engel J., O'Brien J.S. Ann. Neurol. 3, 234 (1978)
- 107) Goldstein M.L., Kolodny E.H., Gascon G.C., Gilles F.H. Trans.Am.Neurol.Assoc. 99,110(1974)
- 108) Durand P., Gatti R., Cavalieri S., Borroni C., Tondeur M., Michalski J., Strecker G. Helv.Pediatr.Acta 32, 391 (1977)
- 109) Justice R.M., Wenger D.A., Naidu S., Rosenthal I.M. Pediatr.Res. 11, 407 (1977)
- 110) Hickmann S., Neufeld E.S. Biochim.Biophys.Res.Comm. 49,992 (1972)
- 111) Sly W.S. in "Structure and Function of Gangliosides" Plenum Press, New York/London, 433(1980).
- 111a) Hasilik A., Neufeld E.F. J.Biol.Chem. Vol.255, No.10, 4946 (1980)
- 112) Michaelis L., Menten L. Biochem. Z. 49, 333 (1913)
- 113) Fischer G., Jatzkewitz H. Biochim.Biophys.Acta 528, 69 (1978)
- 114) Conzelmann E. Dissertation, Ludw.-Max.-Universität München (1979)
- 115) Sandhoff K., Schraven J., Nowoczek G. FEBS Letters 62, 284 (1976)
- 116) Bhavanandan V.P., Yeh A.K., Carubelli R. Anal.Biochem. 69, 385 (1975)
- 117) Shinitzky M., Barenholtz Y. J.Biol.Chem. 249, 2652 (1974)
- 118) Arbeitsanleitung zur Messung der Fluoreszenzpolarisation mit DPH Hrsg. Wiss. Publ. der Fa. Elscint, Wiesbaden, FRG (1976)
- 119) Lenaz G., Curatola G., Masotti L. J. Bioenergetics 7, 223 (1975)
- 120) Rosenberg F.H., Jansson S., Gripenberg J. Anesthesiol. 46, 322 (1977)
- 121) Mastrangelo C.J., Trudell J.R., Edmunds H.N., Cohen E.N. Molek. Pharm. 14, 463 (1978)
- 122) Shinitzky M., Inbar M. Biochim.Biophys.Acta 453, 133 (1976)
- 123) Lineweaver H., Burk D. J.Am.Chem.Soc. 56, 658 (1934)
- 124) Sharom F.J., Grant C.W.M. Biochim.Biophys.Acta 507, 280 (1978)
- 125) Ohnishi S., Ito T. Biochemistry 13, 831 (1974)

- 126) Wallach E.F.D., Knüfermann H.G. "Plasmamembranen", Springer Verlag
Berlin, Heidelberg, New York (1973)
- 127) Moore W.J. "Physical Chemistry" Hrsg. Longmans
(1968)
- 128) De Kruijff B. Second Int.Congr. on Cell Biology,
Berlin, Sept. 1980, pers. Mitteilung
- 129) Cooper R.A. J.Supramol.Struct. 8, 413 (1978)
- 130) Trout A. Vortrag am Second Int.Congr. on Cell Biol.
Berlin, Sept. 1980
- 131) Paphadjopoulos D., Wilson T. In Vitro 16, (1) 55 (1980)
- 132) Bangham A.D., Hill M.W. Meth.Membr.Biol. 1 (1979)
- 133) Helenius A. pers. Mitteilung
- 134) De Kruijff B. Vortrag am Second Int.Congr. on Cell Biol.
Berlin, Sept. 1980
- 135) Lee A.G., Birsdall J.M., Metcalfe
J.C. Biochemistry 12, 1650 (1973)
- 136) Axelrod D., Koppel D.E., Schlessin-
ger J., Elson E., Webb W.W. Biophys.J. 16, 1055 (1976)
- 137) McGrath A.E., Morgan C.G., Radda
G.K. Biochim.Biophys.Acta 426, 173 (1976)
- 138) Pascher I. Biochim.Biophys.Acta 455, 433 (1976)
- 139) Brunngraber E.G. in "Neurochemistry of Aminosugars", Hrsg.
Thomas C.C., Springfield, USA (1979)
- 140) Schwarzmann G. Biochim.Biophys.Acta 529, 106 (1978)
- 141) Callies R., Schwarzmann G., Rad-
sak K., Siegert R., Wiegandt H. Eur. J. Biochem. 80, 425 (1977)
- 142) Informationsschrift der Fa.
Calbiochem GmbH, Giessen Vol.4, Nr.4 (1978)
- 143) Baron C., Thompson T.E. Biochim.Biophys.Acta 382, 276 (1975)
- 144) Stubbs G.W., Smith G.H., Litman B. Biochim.Biophys.Acta 425, 46 (1976)
- 145) Momoi T., Ando S., Nagai Y. Biochim.Biophys.Acta 441, 488 (1976)
- 145) Nagai Y. Iwamori M. Mol.Cell.Biochem. 29, 81 (1980)
- 146) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr
A.L., Randall R.J. J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)
- 147) Tanaka L., Pigman L. J.Biol.Chem. 240, 1487 (1965)
- 148) Tettamanti G., Bonali F.,
Marchesini S., Zambotti V. Biochim.Biophys.Acta 296, 160 (1973)
- 149) Dale R.E., Chen L.A., Brand L. J. Biol. Chem. 252, 7500 (1977)
- 150) Leptz B.R., Barenholz Y., Thomp-
son T.E. Biochemistry 15, 4529 (1976)

- 151) O'Brien J.S., Warner T.G. Clin. Genet. 17, 35 (1980)
- 152) Kress B.C., Miller A.L. Biochim.Biophys.Res.Commun. 81,756(1978)
- 153) Strecker G., Michalski J.C. FEBS Lett. 85, 20 (1978)
- 154) Spritz R.A., Coates P.M. Biochim.Biophys.Acta 582, 164 (1979)
- 155) DenTandt W.R., Leroy J.G., Potier M. Eur. J. Pediatr. 133, 71 (1980)
- 156) Awasthi Y.C., Chuang T.F., Keenan T.W.
Crane L.F. Biochim.Biophys.Acta 226, 42 (1971)
- 157) Gazzotti P., Bode H.G., Fleischer S. J. Biol. Chem. 250, 5782 (1975)
- 158) Warren G.B., Toon P.A., Birdsall N.J.
Lee A.G., Metcalfe J.C. Biochemistry 13, 5501 (1974)
- 159) Sandermann H. Eur.J. Biochem. 62, 479 (1976)
- 160) Gottlieb M. H., Eanes E.D. Biophys. J. 14, 335 (1974)
- 161) Gazzatti P., Petersen S.W. J.Bioenerget.Biomembr. 9, 373 (1977)
- 162) Hakomori S. Vortrag Second Int.Congr. Cell Biology
Berlin, September 1980
- 163) Hakomori S. pers. Mitteilung
- 164) Seemann P. Pharmacol. Rev. 513, 583 (1972)
- 165) Sandhoff K. et al. in Vorbereitung
- 166) Miller K.W., Pang K.J. Nature 263, 253 (1976)
- 167) Trudell J.R., Hubbel W.L., Cohen E.M. Biochim.Biophys.Acta 291,321 (1973)
- 168) Lawrence D.K., Gill E.W. Molec. Pharmacol. 11, 280 (1975)
- 169) Hosein E.A., Lapalme M., Vadas E.B. Biochim.Biophys.Res.Commun. 78,194 (1977)
- 170) Dawson G., McLawhon R., Miller R.J. Proc.Natl.Acad.Sci. 76, 605 (1979)
- 171) Kregel P. Second.Int.Congr.Cell Biology,Berlin,1980
pers. Mitteilung
- 172) Chani-Fournier F.,Pauloin A.,Chani C.Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 2333 (1978)
- 173) Tomasi M., Ansiello C., Battistini A.
D'Agnolo G. FEBS Lett. 106, 309 (1979)
- 174) Cossins R.A. Biochim.Biophys.Acta 470, 395 (1977)
- 175) Rahmann H. pers. Mitteilung
- 176) Aoyama T. Second Int.Congr.Cell Biology,Berlin,1980
pers. Mitteilung
- 177) Moss J., Fishman P.H., Manganiello C.
Vaughan M., Brady R.O. Proc.Natl.Acad.Sci. 73, 1043 (1976)
- 178) Keenan T.W. Vortrag am Second Int.Congr.Cell Biology
Berlin, 1980, ebenso pers. Mitteilung
- 179) Wiegandt H. Vortrag am Second Int.Congr.Cell Biology
Berlin, 1980
- 180) Yu R.K., Ledeen R.W. J. Biol. Chem. 244, 1306 (1969)
- 181) Kohn L.D. Second Int. Congr. Cell Biol. Berlin
(1980), pers. Mitteilung
- 182) Kohn L.D. Vortrag ebenda

5. Material und Methoden

5.1. Verwendete Materialien und Geräte

KB^3H_7 , [^{14}C]-Cholesterin von Amersham-Buchler, Braunschweig

[^{14}C]-Halothan, (Lactitol-1- ^3H (N))-Neuraminlactitol- ^3H] Sialyllactit von New England Nuclear, Dreieich

Halothan von Hoechst, Mannheim

Rohes Gangliosidgemisch, Triton X-100, -4-Methylumbelliferyl-Derivate von Koch & Light, Colnbrook, England

Lachgas und Zählgasgemisch für die Betacamera von Fa. Linde AG, München

Anionenaustauscher AG 1X8, 200-400 mesh, Formiatform von Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Octyl- β -D-Glucopyranosid von Calbiochem, Lahn-Giessen

Lipide wie Sphingomyelin, Lecithin, Kepheline, Sulfatide, Cholesterin,

L- α -Lysophosphatidylcholin, Dimiristoylphosphatidylcholin von Serva, Heidelberg

1,6.-Diphenyl-1,3,5.-Hexatrien (DPH) von Sigma Chemie, München

Sepharose 4 B, Octyl-Sepharose, DEAE-Sepharose von Pharmacia, Schweden

Dünnschicht Plastikfolien, Fertigplatten Kieselgel 60 von Merck, Darmstadt

Alle übrigen Chemikalien, insbesondere Puffersubstanzen, Salze, Lösungsmittel wurden von der Fa. Bender & Hobein, München, mit einer Reinheit von p.a. oder dem höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

Betacamera BF 240, Radiodünnschichtscanner von Berthold, München

Vortex-Genie-Mixer von Scientific Industries, New York, USA

Ultraschallgeräte Sonifier B 12 und Bransonic 12 von Branson Sonic Power Comp. Connecticut, USA

Mikroviskosimeter MV- 1a von Elscint, Wiesbaden

Gasdichte Druckküvetten von Hellma, Müllheim, Baden

Flüssigkeits-Szintillationszähler Mark II von Nuclear Chicago, USA

Dünnschichtplatten-Densitometer TLP von Vitatron Scientific, Niederlande

Eppendorf-Photometer von Eppendorf, Hamburg

pH-Mikrometer mit Thermostateinheit von Heraeus, München

Die bis zu 60 atm druckstabilen Inkubationsgefäße mit Innenvergoldung wurden von Hr. Pastor in der mechanischen Werkstätte des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie in München angefertigt.

5.2. Methoden zur Bestimmung der Neuraminidaseaktivität

5.2.1. Isolierung von Mikrosomen aus Kalbshirn

Hirn eines unmittelbar vorher auf dem Schlachthof München geschlachteten Kalbes wurde sofort auf Eis gekühlt und spätestens 2 Stunden nach Entnahme bei Temperaturen zwischen 0-4°C aufgearbeitet. Die Isolierung von Mikrosomen wurde innerhalb eines Tages beendet. Das Hirn wurde zunächst von Dura und daran haftenden Blutgefäßen befreit und die graue Substanz von weißem Hirngewebe getrennt. Dieses graue Gewebe (je Hirn etwa 50 - 80 Gramm Feuchtgewicht) wurde mit einem Glas-Teflon-Homogenisator bei 800 Umdrehungen (U/min.) pro Minute als 10 % Homogenat in 0.32 M Saccarose (gepuffert mit 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2) zerkleinert und anschließend 30 Minuten bei 13.000 g zur Entfernung von Zellkernen und rohen Mitochondrien-Membranfragmenten zentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand wurde 1 Stunde bei 150.000 g zentrifugiert. Das mikrosomale Sediment wurde zur Entfernung löslicher Proteine und Substrate in 150 mM NaCl/10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 resuspendiert, bei 150.000 g zentrifugiert, nochmals je zweimal mit 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 resuspendiert und zentrifugiert, um ein saccharosefreies, mikrosomales Pellet zu erhalten. Die so gereinigte und gewaschene Mikrosomensuspension wurde als 10-20 % Homogenat in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 resuspendiert und bis zur Verwendung in Polyäthylengefäßen bei -20°C gelagert.

5.2.2. Herstellung von Gewebhomogenaten und löslichen Enzympräparationen humanen Ursprungs

Homogenate von Fibroblasten, Leukozyten und Hirngeweben wurden als 10 % (w/v) Suspension in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 bei 4°C mit einem Glas-Teflon-Homogenisator bei 800 U/min. hergestellt. Aliquote dieser Suspensionen wurden

bei 100.000 g für 1 Stunde zentrifugiert, die erhaltenen Pellets bis zum ursprünglichen Homogenatvolumen mit 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 resuspendiert und mit den resultierenden Überständen direkt nach dieser Aufarbeitung in den enzymatischen Tests eingesetzt, um etwaige einfrierlabile Enzymaktivitäten mitzuerfassen.

5.2.3. Durchführung des enzymatischen Standardtests mit Sialyllactit als Substrat modifiziert nach (116)

In ein Eppendorf-Inkubationsgefäß wurden 200 nmol [^3H]Sialyllactit, vorgereinigt nach (87), gelöst in Äthanol/Wasser 1:1 (v/v); (spez. Aktivität 52.2 Ci/mol) einpipettiert und das Lösungsmittel in einem gelinden Stickstoffstrom unter Erwärmen mit einer Infrarotlampe abgedampft.

Dann wurden bis zum endgültigen Inkubationsvolumen die entsprechenden Mengen entionisiertes Wasser, Pufferlösung und gegebenenfalls andere Zusätze (Lipid-, Salz-, Anästhetika-, Detergens-Lösungen ; in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2) zugegeben. Nach gutem Durchmischen (Vortex-Genie-Mixer) und kurzem Ultraschallen bei 0°C (10 Sekunden im Branson Sonifier B 12, Leistung 100 Watt) wurde die homogene Mischung kurz zentrifugiert (15 Sekunden, Tischzentrifuge), um an der Gefäßwand anhaftende Lösung am Gefäßboden zu konzentrieren. Mit einem Eisbad wurde die Mischung abgekühlt und mit frisch aufgetauter Mikrosomen-suspension (siehe Abschn. 5.2.1.) oder frisch präparierter Enzymsuspension (siehe Abschn. 5.2.2.) versetzt, gut durchmischt und nochmals 10 Sekunden bei 0°C ultraschallt. Die eingesetzten Proteinmengen betrugen in diesem Test zwischen 50 und 400 μg Protein/100 μl . Als enzymatisch inaktive Kontrollen dienten Enzympräparationen, die vorher 10 bis 15 Minuten bei 100°C hitzedenaturiert worden waren.

Anschließend wurden sämtliche Proben entweder unter Normalbedingungen oder gegebenenfalls im Autoklaven (115) 1 Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch rasches Abkühlen im Eisbad gestoppt, jeder Ansatz auf eine kleine Ionenaustauschersäule (0.3 x 4.5 cm, gefüllt mit Ionenaustauscher AG 1X8, Formiatform) aufgetragen und mit 500 μl 1 mM Lactitlösung (in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2) versetzt.

Eluiert wurde jede Säule mit 2 ml der Lactitlösung (s.o.), um das Reaktionsprodukt [^3H]Lactit von nicht-gespaltem [^3H]Sialyllactit abzutrennen. Das an dem Austauscherharz haftende Substrat wurde dann mit 2 ml 0.5 M Na-Formiatlösung ausgewaschen. Die separierten Produkt- und Edukteluate wurden mit je 17.5 ml Szintillatorlösung Unisolve 100 (Fa. Zinsser, Frankfurt) versetzt, gemischt und bezüglich ihres Radioaktivitätsgehaltes im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Nach Abzug der Werte für die hitzedenaturierten Kontrollansätze ließen sich unter Berücksichtigung der eingesetzten Substrat- und Proteinmengen die spezifischen Enzymaktivitäten berechnen. Die Standardabweichung dieses Testverfahrens lag gewöhnlich bei 3%, bei Zusatz von fluiditätsverändernden Substanzen waren auch etwas höhere Schwankungen zu beobachten. Alle im Teil 2. dieser Arbeit angegebenen Aktivitätsmengen beruhen mindestens auf Doppelbestimmungen.

Durch die in Zusammenarbeit mit G. Scheel (87) sowie an Hand bereits früher durchgeführter Messungen zur Bestimmung der Substrat- und Proteinabhängigkeit war sichergestellt worden, daß die Linearität der enzymatischen Bestimmung bis zu einer Proteinmenge von 400 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ und Substratkonzentrationen von 0.1 bis 2 mM unter den angegebenen Verhältnissen gewährleistet ist. Deshalb sind die für unterschiedliche Gewebeproben (Mikrosomen, Hirnhomogenate von Patienten mit ML I und ML II, Fibroblasten- und Leukozytenkulturen) berechneten spezifischen Neuraminidaseaktivitäten bis zu einer Proteinmenge von 400 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ von der eingesetzten Enzymmenge unabhängig und können direkt miteinander verglichen werden.

5.2.4. Durchführung des enzymatischen Standardtests mit Gangliosid G_{D1a} als Substrat

Rohe, käufliche Rinderhirngangliosidmischung wurde nach Svennerholm (11) in die einzelnen Reinganglioside aufgetrennt. Das so gereinigte Gangliosid G_{D1a} wurde dann nach Methoden von Tanaka et al. (147) sowie G. Schwarzmann (140) in der Doppelbindung des Sphingosinanteils mit KBT_4 unter der Katalyse von Palladiumchlorid tritiert, mittels präparativer Dünnschichtchromatographie in Laufmittel I und II (siehe Abschn. 5.9.) nachgereinigt und nach Verdünnen mit

unmarkiertem, ebenso gereinigten Gangliosid G_{D1a} in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 in einer Konzentration von 1 mM (spez. Aktivität 62 Ci/mol) bei -20°C eingefroren.

Nach Einpipettieren von 10 nmol [^3H] G_{D1a} -Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäße erfolgten die weiteren Arbeitsschritte analog den für den Sialyllactit-Test beschriebenen (vgl. Abschnitt 5.2.3.). Zur Quantifizierung der enzymatischen Aktivität wurden nach der Inkubation bei 37°C alle Ansätze rasch auf 0°C abgekühlt (Eisbad). Aliquote von je 40 μl wurden auf Dünnschicht-Plastikfolien aufgetragen, getrocknet und das Substrat [^3H] G_{D1a} von dem amphiphilen Reaktionsprodukt [^3H] G_{M1} in Laufmittel III (siehe Abschnitt 5.9.) voneinander getrennt. Die Folien wurden dann für ca. 15 Minuten bei 60°C getrocknet und in der Betacamera fotografiert. Jeweils gleiche Flächen der mit Bleistift angezeichneten Substrat- und Produktflecke wurden ausgeschnitten, in Zählgläsern mit Szintillatorlösung versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge ließen sich nach Abzug der Werte für hitzeinaktivierte Enzympräparationen die spezifischen Neuraminidaseaktivitäten berechnen. Die Standardabweichung dieses Tests betrug in der Regel etwa 5 %, bei Zusatz von Lipiden und insbesondere klinisch angewandten Halothankonzentrationen (vgl. Abschnitt 2.2.3.) wurden auch höhere Standardabweichungen gefunden. Die in Teil 2. dieser Arbeit angegebenen Meßwerte beruhen mindestens auf Doppelbestimmungen.

In Zusammenarbeit mit G. Scheel (87) sowie an Hand bereits früher durchgeführter Messungen zur Bestimmung der Substrat- und Proteinabhängigkeit (84) war sichergestellt worden, daß die Linearität der enzymatischen Bestimmung bei Substratkonzentrationen von 0.1 mM bis zu einer Proteinmenge von 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ unter den angegebenen Verhältnissen gewährleistet ist.

5.2.5. Durchführung des enzymatischen Standardtests mit Gangliosid G_{M3} als Substrat

Dieser Test wurde im Labor von Prof. Miyatake nach unseren Angaben folgendermaßen durchgeführt: 10 nmol an Gangliosid G_{M3} wurden in 20 μl (0.5 M Glycolatpuffer, pH=3.85 mit 25 mM CaCl_2 und 675 mM NaCl) bei 0°C gemischt und kurz

ultrabeschallt. Nach Zugabe von 100 μ g Zellprotein (Fibroblasten, Leukozyten) in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 und kurzem Mischen wurde der Ansatz von 100 μ l 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach raschem Abkühlen des Inkubationsansatzes auf 0°C wurde die Menge an freigesetzter Sialsäure aus dem Gangliosid G_{M3} nach der Methode von Warren (100) bestimmt. Als Kontrolle dienten Ansätze, bei denen die Enzympräparation vorher 10 Minuten bei 100°C hitzeinaktiviert worden war. Durch die Bestimmung des endogenen Sialsäuregehaltes der Enzympräparation und unter Berücksichtigung der hitzeinaktivierten Inkubationsansätze ließ sich die Menge der aus dem Gangliosid G_{M3} abgespaltenen Sialsäure quantifizieren. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, daß dieser Test naturgemäß mit einer höheren Ungenauigkeit als das oben beschriebene radioaktive Testverfahren mit dem Gangliosid [³H]G_{D1a} behaftet ist (98).

Alle im Teil 2.1. (Pathobiochemische Untersuchungen) durchgeführten Enzymaktivitätsbestimmungen der Neuraminidase wurden in Gegenwart von 100 mM Glycolatpuffer, mit 25 mM CaCl₂ und 135 mM NaCl, pH=3.85 vorgenommen.

5.3. Bestimmung von lipid- und proteingebundener Sialsäure

Die Präparation der Sialylglycolipide aus Hirngeweben von Patienten mit ML I und ML II sowie gleichaltrigen Kontrollpersonen erfolgte nach beschriebenen Verfahren. Dabei wurden tiefgefrorenen Gewebeproben mit phosphatgepuffertem Tetrahydrofuran nach Tettamanti et al. (148) extrahiert, nach der zweiphasigen Verteilung mit Diäthyläther und Wasser wurde die gangliosidenthaltende, wässrige Phase am Rotationsverdampfer bei 30-35°C konzentriert, zweimal gegen Aqua bidest. dialysiert und an Silicagel H chromatographiert (Lösungsmittel A: Chloroform/Methanol/Wasser 55:20:3 (v/v), Lösungsmittel B: Chloroform/Methanol/Wasser 60:35:7 (v/v)). Die lipidgebundene Sialsäure wurde nach Berra et al. (9) bestimmt, während der Gehalt an proteingebundener Sialsäure im lipidfreien Rückstand durch viermaliges Hydrolysieren mit 0.1 M H₂SO₄ bei 80°C (45 Minuten) erfolgte. Die vereinten Hydrolysate wurden mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 50 ml ergänzt. Aliquote von je 5 ml wurden an kleinen Glassäulen (0.6 x 6 cm,

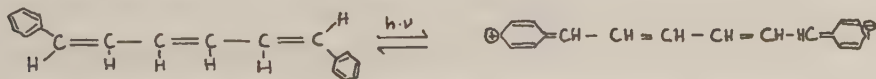
gefüllt mit Anionenaustauscher-Harz AG 1X8, Formiatform) chromatographiert. Die Sialsäure wurde mit je 8 ml 2 M Acetatpuffer, pH=4.6 eluiert und nach Warren et al. quantifiziert (100). Der Gesamtgehalt an Sialsäure wurde mit einem kleinen Teil desselben Gewebeschnittes durch wiederholte Hydrolyse mit 0.1 M H₂SO₄ und nachfolgender analoger Aufarbeitung (s.o.) bestimmt.

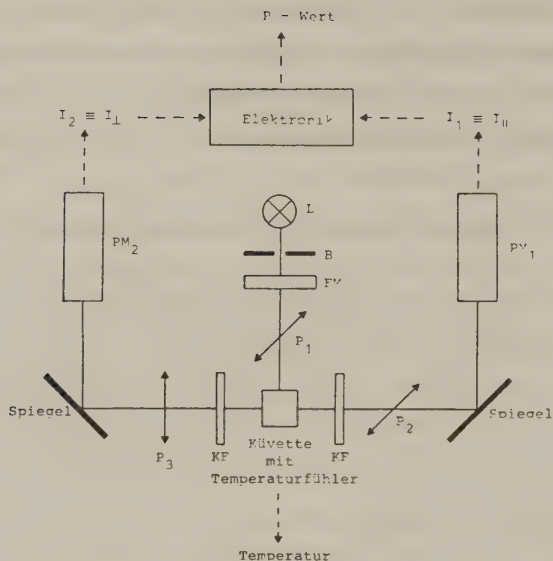
5.4. Bestimmung des Sialyloligosaccharidgehaltes in humanen Gehirnen

Gewebeprobe von etwa 0.3 Gramm postmortalem Hirngewebe von Patienten mit ML I und ML II sowie gleichaltrigen Kontrollpersonen wurden bei 0-4°C je neunmal mit 300 µl Aqua bidest. in einem 1 ml Glas-Teflon-Homogenisator zerkleinert und von unlöslichen Membranbruchstücken durch kurze (5 Minuten) Zentrifugation bei 1200 g (Tischzentrifuge TJ 6 von Beckman Instruments, München) befreit. Die vereinten Überstände wurden gefriergetrocknet, das Lyophilisat mit 1 ml destilliertem Pyridin extrahiert und nach der Methode von Humbel und Collart (101) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Nach Ansprühen der Dünnschichtplatten mit Kagi-Sprühereagens (vgl. Abschn. 5.9.) und anschließendem Entwickeln wurden die Sialyloligosaccharidbanden der Patientengewebe mit den der Kontrollpersonen am Vitatron Densitometer semiquantitativ im Durchlicht mit einer Wolframlampe ausgewertet. Nach diesen Untersuchungen war der Gehalt an Sialyloligosacchariden im Hirngewebe von Patienten mit ML I und ML II gegenüber den Kontrollgeweben um das Doppelte vermehrt.

5.5. Messung der Mikroviskosität in Membranphasen

Eine schematische Abbildung des Mikroviskosimeter MV 1a ist auf der folgenden Seite gezeigt. Linear polarisiertes Licht gelangt aus dem Polarisator P₁ zur Probenküvette und induziert in dem Membranmarker 1.6.-Diphenyl-1.3.5.-Hexatrien (DPH) einen Dipol (s.u.)





- L = Quecksilber-Hochdrucklampe
- B = Lochblende
- FM = Filtermonochromator
- P = Polarisator
- KF = Kantenfilter
- PM = Photomultiplier
- I = Lichtintensität

Abb. 25 Schematischer Aufbau des Microviscosimeters MV-1a
(Fa. Elscint GmbH, Wiesbaden)

Die mittlere Lebensdauer τ dieses Dipolmomentes in DPH beträgt etwa 10 ± 0.5 nsec und wurde bereits früher in Zusammenarbeit mit G. Scheel für die verwendeten Lipidphasen bestimmt. Wegen der begrenzten Freiheitsgrade der Rotation von DPH in Lipidphasen (anisotropen Medien), wird das emittierte Fluoreszenzlicht mehr oder weniger depolarisiert. Dieses depolarisierte Fluoreszenzsignal wird durch Kantenfilter in eine vertikale und horizontale Komponente aufgespalten, so daß die Photomultiplier PM Fluoreszenzlicht parallel ($\parallel$) und senkrecht ($\perp$) zum einfallenden Lichtstrahl verstärken. Eine Recheneinheit am Ausgang der Photomultiplier errechnet aus den Intensitäten I den sog. "P-Wert" (Polarisationswert) nach

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Da der Küvettenraum über ein automatisch regelbares Thermoelement sowohl auf eine bestimmte Temperatur als auch auf ein variables Temperaturprogramm eingestellt werden kann, läßt sich der jeweilige temperaturabhängige P-Wert mit der entsprechenden Temperatur auf einem nachgeschalteten Zweikanalschreiber registrieren. Die Temperaturabhängigkeit des P-Wertes ist nach folgender Gleichung gegeben

$$\frac{\frac{1}{P} - \frac{1}{3}}{\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}} = \frac{r}{r_0} = 1 + C(r) \frac{T \cdot \tau}{\eta}$$

wobei $P_0 = 0,46$ und die Fluoreszenzanisotropie $r_0 = 0,362$ nach (117) bereits bekannt waren. T ist die absolute Temperatur, τ die Lebensdauer des angeregten Zustandes von DPH, η die Mikroviskosität (angegeben in poise) und $C(r)$ der kritische, molekulare Anisotropieparameter, der durch Vergleich der vorgegebenen Lipidphase mit einer Referenzflüssigkeit bekannter Viskosität für verschiedene Temperaturen ermittelbar ist. Als eine derartige Referenzsubstanz wird flüssiges Paraffin verwendet, da dessen physikalisch-chemischen Voraussetzungen weitgehend die Verhältnisse im Inneren von Lipidphasen simulieren können (149). Löst man DPH in einer Paraffinlösung und bestimmt P bzw r sowie τ und η in Abhängigkeit von der jeweiligen Temperatur, so läßt sich eine Eichkurve aufstellen, in der $\frac{r}{r_0} - 1$ gegen $\frac{T \cdot \tau}{\eta}$ aufgetragen wird. Die Steigung dieser Kurve ist gleich $C(r)$. Zu jedem beliebigen Wert für r_T oder P_T läßt sich aus dieser Kurve der zugehörige $\frac{T \cdot \tau}{\eta}$ -Wert ablesen. Eine derartige Eichkurve wurde von der Fa. Elscint zusammen mit dem Mikroviskosimeter geliefert.

5.1. Mikroviskositätsmessungen mit Reinlipiden

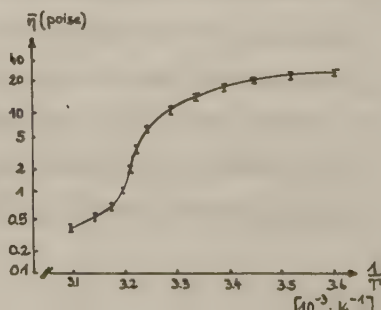
Als Beispiel für die Brauchbarkeit der Mikroviskositätsbestimmung in Lipidphasen wird das Meßverfahren für Liposomen aus Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin im Folgenden beschrieben. Die sowohl für dieses Lipid als auch für die anderen (vgl. Abschnitte 2.2.2 und 2.2.8) Lipide erhaltenen Ergebnisse wurden mit Literaturdaten von Lentz et al. (150) verglichen.

5.5.2. Darstellung von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin-Liposomen und Bestimmung der Mikroviskosität in Abhängigkeit von der Temperatur

10 mg synthetisches Dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylcholin wurden in 1.5 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) gelöst. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der farblose Rückstand mit 10 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 versetzt, gemischt und die erhaltene Suspension bei 37°C im Ultraschallgerät Bransonic 12 für 15 Minuten bei 100 Watt Leistung beschallt. Die tyndallisierende Mischung wurde 30 Minuten bei 100.000 g bei 40°C zentrifugiert, das Sediment verworfen und der nun geklärte Überstand mit 1 ml einer 10⁻⁶M DPH-Suspension (in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2) versetzt. Diese Mischung wurde bei 37°C unter gelegentlichem Rühren in der Probeneinheit des Mikroviskosimeter für 30 Minuten inkubiert. Der Einbauprozess von DPH in die Liposomenphase wurde durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität am Photomultiplier PM 1 verfolgt. Vorversuche hatten sichergestellt, daß nach etwa 30 Minuten Inkubationsdauer ca. 80 Prozent der maximal erreichbaren Intensität zu erhalten sind (87).

Die Fluoreszenzpolarisation P wurde nun in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt und mit den entsprechenden Werten für $\frac{T \cdot \tau}{\eta}$ korreliert. Die folgende Abbildung zeigt eine Darstellung von $\log \bar{\eta}$ gegen $1/T$, wobei nach der Tangentialmethode der Phasenumwandlungspunkt für die verwendeten Liposomen bei 37.5°C liegt. Dieser Wert liegt zwischen dem für unilamellare Vesikel (36.4°C) und multilamellierte Vesikel (41.1°C). Da die Liposomen nach einer sehr einfachen Methode gewonnen wurden, ist die Übereinstimmung mit den von Lentz et al. (150) publizierten Ergebnissen als sehr gut zu bezeichnen.

Abb. 30 Temperaturabhängiger Verlauf der Mikroviskosität in Liposomen aus Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (Bedingungen siehe Text)



5.5.3. Mikroviskositätsbestimmung in Mikrosomensuspensionen

100 μ l einer wässrigen Anästhetika- oder Lipidsuspension (in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2, die zunächst bei 37°C für 15 Minuten in einem gasdichten Inkubationsgefäß ultrabeschallt worden war (vgl. Abschnitte 2.2.2., 2.2.3. und 2.2.8) wurde auf 0°C abgekühlt und möglichst rasch mit 80 μ l einer 2,5 μ M DPH-Suspension (in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2) und 20 μ l einer 5 mg Protein/ml enthaltenden Mikrosomensuspension (in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2) versetzt.

Für die in Abschnitt 2.2.3. gezeigten Ergebnisse wurden diese Vorarbeiten direkt in einer gasdichten Druckkuvette durchgeführt.

Der Ansatz von 200 μ l enthielt je nach Testbedingungen zwischen 100 und 200 μ g Mikrosomenprotein, 0.2-0.5 nmol DPH und die in Abschnitt 2.2. angegebenen Zusätze, sowie 1 μ mol Tris/HCl-Puffer, pH=7.2. Diese Suspension wurde 30 Sekunden gemischt, 1 Minute im Eisbad ultrabeschallt und 30 Minuten im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen auf die entsprechende Meßtemperatur wurden die Ansätze in die Fluoreszenzkuvette überführt oder direkt in der gasdichten Druckkuvette im Mikroviskosimeter untersucht. Als Kontrollen wurden Messungen mit identisch vorbehandelten Mikrosomensuspensionen ohne Zusätze durchgeführt. Temperaturprofile von P wurden sowohl bei 4°C für steigende als auch bei 47°C für fallende Temperaturen ($\Delta T = 1$ bzw. 2.5°C/Minute) aufgenommen.

5.6. Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Halothan zwischen Puffer-, Gas- und Membranphase

Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit R. Pellkofer durchgeführt. In eine Suspension von 200 μ g Mikrosomenprotein in 200 μ l Gesamtlösung (in phosphatgepufferter Kochsalzlösung, pH=7.2) wurde über einen Zeitraum von 40 Minuten bei 37°C mit einer feinen Kanüle 14 C-Halothan/N₂-Gasmischung eingeblasen. Dann wurden Aliquote von 20 μ l entnommen, im Flüssigkeitsszintillationszähler auf ihre Radioaktivität getestet und mit identisch vorbehandelten Kontrollansätzen ohne Mikrosomenzugabe be-

züglich der in der Flüssigkeit gebundenen Radioaktivität verglichen. Notwendige Quench-Korrekturen wurden von Herrn Pellkofer nach der "Externen Standard Methode" durchgeführt. Da bekannt war, daß Mikrosomen zu etwa gleichen Teilen aus Lipid und Protein zusammengesetzt sind (126), ließ sich bei Kenntnis des Gasraumes in den Inkubationsgefäßen (1.48 cm^3) sowie des bekannten Flüssigkeitsvolumen von $200 \mu\text{l}$ folgende Tabelle aufstellen, in der die Verteilungskoeffizienten von Halothan zwischen der Membran- und flüssigen Phase angegeben sind ($\pm$ Standardabweichungen bei 2 Doppelbestimmungen):

Tabelle 7: Verteilungskoeffizienten von Halothan

Vol% ^{14}C Halothan i.d. Gasphase (N_2)	mg ^{14}C Halothan g Membranlipid	mg ^{14}C Halothan g Membran	mmol ^{14}C Halothan mol Membranlipid	mol % Halothan mol Membran mol ^{14}C Halothan mol ^{14}C Halothan mol ^{14}C Halothan
3%	18.5 ± 2.5	9 ± 1.0	72 ± 10	4.3
1.5%	9 ± 2.0	4 ± 1.0	29 ± 8	3.5
0.5	2.7 ± 2.1	1.25 ± 1.2	9 ± 7	2.1

Dies bedeutet, daß z.B. von 3 Vol% Halothan in der N_2 -Gasphase nur etwa 4.3 mol-%-Anteile Halothan bei 37°C in der Lipidphase gebunden werden. Da das Pipettieren von reinem Halothan bei Raumtemperatur wahrscheinlich zu Verdampfungsverlusten geführt hätte, wurde im Eisbad eine wässrige, gesättigte Halothanlösung bereitet, in der nach Aussage der Herstellerfirma (Hoechst) 8 Gewt-%-Anteile Halothan gelöst sind. Von dieser Lösung wurden entsprechende Mengen für die in Abschnitt 2.2.3. durchgeführten Messungen der Neuraminidaseaktivität sowie den Mikroviskositätsbestimmungen in die Inkubationsgefäße einpipettiert.

5.7. Einbau mizellarer Ganglioside in Mikrosomen

Die angegebene (vgl. Abschnitt 2.2.9.) Menge an Gangliosid (radioaktiv markiertes Reingangliosid oder Gangliosidmischung; gelöst in 10 mM Tris/HCl-Puffer, $\text{pH}=7.2$) wurde 10 Sekunden bei 0°C im Ultraschall (Bransonic 12, 100 Watt Leistung) durchmischt. Aus dieser Lösung wurden steigende Mengen in eine

Mikrosomensuspension von 100 μ g Protein in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2 pipettiert und die Mischung nochmals 10 Sekunden bei 0°C ultrabeschallt. Anschließen wurde die Suspension für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Gangliosidmizellen und Mikrosomenmembranen zu gewährleisten. Die weiteren Aufarbeitungsschritte zur Bestimmung der Einbauraten mizellarer Ganglioside in Mikrosomenmembranen sind im Text und den Legenden von Abschnitt 2.2.9. beschrieben.

5.8. Kontrollversuche zu den im Abschnitt 2.2.10. und Abschnitt 2.2.11. gezeigten Ergebnissen mit dem Detergens Octyl- β -D-Glucopyranosid

- a) Es wurde untersucht, ob die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (146) durch das Detergens gestört wird. Dies war innerhalb der angegebenen Detergensenkonzentrationen nicht der Fall.
- b) Weiterhin wurde untersucht, ob sich Detergensmizellen von Octyl- β -D-Glucopyranosid in Gegenwart von Mikrosomenprotein bei 100.000 g sedimentieren lassen. Hierzu wurden reine Detergens-Pufferlösungen und die verwendeten Detergens-Mikrosomenhomogenate (bis zu 60 mM Detergens), suspendiert in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7.2, mit einem batteriebetriebenen Minihomogenisator zerkleinert und 10 Sekunden bei 0°C im Branson 12 ultrabeschallt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 100.000 g wurden Aliquots von 20 μ l der erhaltenen Überstände, auf das ursprüngliche Volumen ergänzte und rehomogenisierte Pellets sowie nicht zentrifugierte Detergensmikrosomenhomogenate und Kontrollansätze auf Dünnschichtplatten aufgetragen und in Laufmittel IV (siehe Abschnitt 5.9.) chromatographiert. Nach dem Trocknen und Entwickeln der Dünnschichtplatte wurde die Intensität der Kontroll- und Testflecke miteinander verglichen. Danach war kein Unterschied in der Detergensverteilung zwischen Ausgangshomogenat, Überstand oder Pellet festzustellen. Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine radioaktiv-markierte Detergenspräparation zu erhalten war, ist diese rein qualitative Untersuchung nur bedingt geeignet, ein Sedimentieren von Detergensmolekülen bei 100.000 g vollkommen auszuschließen.

5.9. Dünnschichtchromatographie

Sowohl für die Enzymaktivitätsbestimmungen mit G_{D1a} als Substrat (vgl. Abschnitt 5.2.4.) als auch für andere Untersuchungen war es nötig, die Reinheit der eingesetzten Substanzen zu überprüfen. Als Adsorbens für diese Untersuchungen wurden Fertigplatten von Merck verwendet (Absch. 5.1.) Als Laufmittel dienten

Laufmittel I:	Chloroform/Methanol/Wasser mit 0.02% $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	55:45:10 (v/v/v)
Laufmittel II:	" " 2,5 N Ammoniak	60:40:9 "
Laufmittel III:	Butanol/Pyridin/0.55 KCl-Lösung	6: 3:2 "
Laufmittel IV:	Chloroform/Methanol/Wasser	70:30:5 "

Nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung wurden die Platten an der Luft oder in einem Trockenschrank getrocknet und mit unterschiedlichen Sprühreagenzien mäanderförmig angesprüht:

Sprühreagens Kagi :	Eisessig/ H_2SO_4	50:2 (v/v)
" Kagi-Miescher:	" / " / Anisaldehyd	50:2:0.3 (v/v/v)
Resorcinol-HCl-Spray :	2 Gramm Resorcinol werden in 100 ml 50 % Salzsäure gelöst.	

Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurden die besprühten Platten für 15 bis 20 Minuten im Trockenschrank erhitzt. Im Falle von Resorcinol-Spray wurden die Platten während dieser Zeit mit einer Glasplatte abgedeckt.

5.10. Zellzüchtung

Menschliche Hautfibroblasten von Patienten und Kontrollpersonen (Zellstamm F 185, F 210, F 212, F 215) wurden unter Zusatz von 15 % foetalem Kälberserum in "Eagles modified medium (LS-Laborservice, München) und 2 Gramm $NaHCO_3$ /L in einer 5% CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde nach etwa 2 Tagen erneuert, konfluente Subkulturen wurden mit 0.85 % NaCl in doppelt destilliertem Wasser gespült, von der Unterlage abgeschabt und zentrifugiert (2 Minuten, ca 600 g). Die erhaltenen Zellpellets wurden bis zu ihrer Verwendung bei $-70^\circ C$ gelagert.

5.11. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et a. (146), wobei die Proben vor der eigentlichen Proteinbestimmung in einer alkalischen Hydrolyse in 1 N NaOH (1 Stunde) bei 100°C vorbehandelt wurden, um sämtliche Membranproteine zu erfassen.

5.12. Handversuch zur Bestimmung des Gangliosidmusters in postmortalem Hirngewebe von Morphinsüchtigen

Das Gewebe wurde von Hr. Gramsch aus der Abteilung Neuropharmakologie zur Verfügung gestellt.

Hirne von 5 Patienten, die an einer Überdosis Morphin gestorben waren (Alter zwischen 17 und 33 Jahren) wurden nach (11) extrahiert. Das Gangliosidmuster dieser Gewebe wurde mit dem von 22 und 28 Jahre alten Kontrollpersonen semiquantitativ verglichen (vgl. Abschnitte 5.4. und 5.9). Auffällige Unterschiede im Lipidmuster waren nicht festzustellen.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit berichtete über enzymatische Studien an einem Protein der Plasmamembran, die membrangebundene Neuraminidase (Sialidase). Dieses Enzym katalysiert sowohl die hydrolytische Spaltung von Sialyloligosacchariden als auch von Gangliosiden mit endständig gebundener Sialsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure).

Da nach Untersuchungen anderer Autoren festgestellt wurde, daß sich in Fibroblastenkulturen von Patienten mit Sialidosen (Mucopolidose I und II) Defekte einer Sialidase gegenüber wasserlöslichen Sialyloligosacchariden nachweisen ließen, sollte sich ein Enzymdefekt auch an postmortalem Hirngewebe der Patienten demonstrieren lassen. Diese Annahme war durch die vorliegenden Untersuchungen nicht eindeutig zu bestätigen, da sowohl gegenüber Gangliosid- als auch Sialyloligosaccharid-Substraten in Nervengewebe von Mucopolidose I und II normale oder nur partiell verminderte Abbauraten der Substrate nachgewiesen werden konnten. Ebenso erbrachten Messungen zur Aktivität einer Reihe lysosomaler Hydrolasen im Hirngewebe keine Hinweise auf einen hirnspezifischen Enzymdefekt bei Mucopolidosen I und II. Zudem wies das Gangliosidmuster der Patientengewebe keine drastischen Unterschiede gegenüber gleichaltrigen Kontrollgeweben auf. Die beobachtete Erhöhung des Sialyloligosaccharidgehaltes in beiden Patientengeweben könnte deshalb allenfalls durch den Ausfall eines Spurenenzyms erklärbar sein.

Die Vermutung einer organspezifischen Verteilung von Sialidasen ließ sich durch einen Vergleich von Nerven-, Fibroblasten- sowie Leucozytengewebe bestätigen. So betrug z.B. die Aktivität des gangliosidsplattend Enzyms in Fibroblasten und Leucozyten nur etwa 10 Prozent der hirnspezifischen Aktivität.

Die Neuraminidaseaktivität wurde bei einem Patienten mit "Adult Type Neuronal Storage Disease" in Fibroblasten- und Leucozytenhomogenaten mit Gangliosid- und Sialyloligosaccharid-Substraten untersucht. Dabei zeigten beide Zellhomogenate zwar eine normale Aktivität der gangliosidsplattend Siali-

dase, jedoch wurde erstmals bei dieser Krankheit ein Enzymdefekt gegenüber dem wasserlöslichen Substrat Sialyllactit in Fibroblastenhomogenaten des Patienten festgestellt. Nach den vorgelegten Ergebnissen sind also Patienten mit "Adult Type Neuronal Storage Disease" eindeutig als Träger einer Sialidase-Mangelerkrankung identifizierbar.

Im weiteren Verlauf der Arbeit konzentrierten sich die Untersuchungen auf Studien zur Wechselwirkung der membrangebundenen Neuraminidase mit wasserlöslichen und membranständigen Substraten. Die Beobachtung erhöhter Abbauraten von Gangliosidsubstraten in Gegenwart membranfluidisierender Agenzien, wie z.B. flüssigen oder gasförmigen Anästhetika sowie Lipiden mit niedrigen Phasenumwandlungstemperaturen, wurde durch ein membranenzymologisches Konzept erklärt, das die Lateraldiffusion membrangebundener Substrate mit deren Abbaurate innerhalb der Membranebene verknüpft. Daten zur Ionen- und pH-Abhängigkeit der Substratspaltung konnten das Auftreten verschiedener Sialidasen in der Enzympräparation weitgehend ausschließen. Nach einer Überprüfung der Bindungsverhältnisse exogener Ganglioside an neuronale Membranpräparate schloß die Arbeit mit ersten Daten zur Anreicherung und näheren Charakterisierung des Enzyms.

Lebenslauf

Am 12. September 1948 wurde ich in München als zweites Kind von Betti Pallmann, geb. Radler, und Dr. phil. Gerhard Pallmann geboren. Nach dem Besuch der Volksschule wechselte ich auf das humanistische Ludwigs-Gymnasium über und legte im Jahre 1969 am Maximilian-Gymnasium in München das Abitur ab.

Im Wintersemester 1969/70 immatrikulierte ich mich zum Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilian Universität in München und bestand dort im Juli 1975 die mündliche Diplomhauptprüfung. Meine Diplomarbeit mit dem Thema "Studien über die membrangebundene Neuraminidase" verfaßte ich von November 1975 bis Januar 1977 in der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München. In Weiterführung dieser Arbeit entstand bis Mai 1980 die vorliegende Dissertation.

Seit Januar 1980 bin ich als selbstständiger wissenschaftlicher Projektleiter und als Gutachter tätig.

